

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :

C12N 15/62, 15/65, 15/70, C07K 16/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/35022

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

25. September 1997 (25.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/01130

(22) Internationales Anmeldedatum:

15. März 1996 (15.03.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-
PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER
WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Verwal-
tungsanschrift, Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MAURER, Jochen [DE/DE];
Pfleghofstrasse 10, D-72070 Tübingen (DE). JOSE, Joachim
[DE/DE]; Hartmeyerstrasse 48, D-72076 Tübingen (DE).
MEYER, Thomas, F. [DE/DE]; Spemannstrasse 30, D-
72076 Tübingen (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H., usw.; Kopernikusstrasse 9, D-
81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US,
europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: EXPORT SYSTEMS FOR RECOMBINANT PROTEINS

(54) Bezeichnung: EXPORTSYSTEME FÜR REKOMBINANTE PROTEINE

(57) Abstract

The present invention relates to vectors, host-vector combinations and processes for producing stable fusion proteins consisting of a carrier protein and a passenger protein. Expression of the fusion protein results in exposure of the passenger domains on the surface of bacterial cells, in particular *Escherichia coli*. If necessary, the passenger domains can be released into the medium by proteases, e.g. by selected host factors such as OmpT.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere *Escherichia coli* Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Exportsysteme für rekombinante Proteine

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere Escherichia coli Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Trägerproteinen oder Trägerproteinanteilen aus natürlichen Proteinen, die als Aminosäuresequenzen in Datenbanken oder Dateien vorliegen und entsprechend ihrer Eigenschaften Autotransporter genannt werden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht Verfahren zur Identifizierung und Selektion von Bakterien, die mindestens ein Passagierprotein auf ihrer Oberfläche mit definierter Affinität zu einem Bindungspartner exprimieren, sowie deren Verwendung für diagnostische Zwecke. Insbesondere erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von Peptid-Bibliotheken auf der Oberfläche von Bakterienzellen, mit deren Hilfe beispielsweise die Bestimmung des Liganden mit der höchsten Affinität bei Antikörpern, MHC-Molekülen oder anderen Komponenten des Immunsystems möglich ist.

Darüberhinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Produktion von Fusionsproteinen, die sich aus Anteilen schwerer und leichter Antikörperdomänen und einem Autotransporter zusammensetzen, und deren Transport durch die bakterielle Zellhülle. In einer spezifischen Ausführungsform wird letzt-

lich die zielgerichtete Varianz von bindungsaktiven rekombinanten Antikörpern und deren funktionelle Präsentation auf der Zelloberfläche von Escherichia coli möglich.

5 Generell erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von rekombinanten Proteinen, die Rezeptoren oder Liganden sein können, auf der Bakterienoberfläche, sowie die Selektion aufgrund der Bindungsaffinität zu einem Bindungspartner, womit eine damit einhergehende Selektion eines klonalen
10 Produzenten möglich wird.

Erfindungsgemäß ist auch eine Verwendung von Bakterien, die Proteinfusionen auf der Zelloberfläche exprimieren und die gebunden an ein Trägermaterial oder in Lösung vorliegen, zur
15 gezielten Anreicherung oder Reinigung eines zu den Oberflächen-exponierten Proteindomänen Affinität zeigenden Bindungspartners. Darüberhinaus betrifft die vorliegende Erfindung auch die Oberflächenexpression von Enzymen oder anderen Proteinen mit biologisch, chemisch oder technisch relevanten
20 Eigenschaften, sowie, im Bedarfsfalle, deren gezielte Freisetzung in das umgebende Milieu.

Die Oberflächenexposition von rekombinanten Proteinen auf Bakterienzellen ist ein Verfahren mit einer Vielzahl von möglichen mikrobiologischen, molekularbiologischen, immunologischen oder technischen Anwendungen. Durch Produktion von rekombinanten Proteinen auf diese Art und Weise werden ihre Eigenschaften, z.B. Bindungsaffinitäten oder enzymatische Aktivitäten (Francisco et al., Bio.Technology 11 (1993) 491 -
30 495) zugänglich, ohne daß ein weiterer Schritt, wie beispielsweise der Aufschluß der Produzentenzelle notwendig ist. Da nur eine limitierte Anzahl von Faktoren natürlicherweise auf der Bakterienoberfläche exprimiert werden, ist zusätzlich eine spezifische Anreicherung des rekombinanten Proteins im Vergleich zu einer cytosolischen Produktion gegeben.
35 Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß man mit den gleichen Methoden, mit denen man das gesuchte rekombinante Pro-

tein selektioniert, auch den Produzenten dieses Proteins, eine Bakterienzelle isolieren kann, und somit einen klonalen Produzenten erhält, der dauerhaft gelagert, stabil reproduziert und in großem Maßstab vermehrt werden kann.

5

Für die Präsentation rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche wurden bisher verschiedene Systeme verwendet, die jedoch ausnahmslos auch natürlicherweise für den Transport oder die Sekretion bakterieller Oberflächenproteine dienen (Little
10 et al., TIBTECH 11 (1993), 3 - 5). Sinnvollerweise wurde dabei die DNA-Region, die natürlicherweise für das zu transportierende Protein, den Passagier, kodiert, ersetzt oder ergänzt durch die kodierende DNA-Region des gewünschten rekombinanten Proteins, wobei jedoch die kodierenden Bereiche der
15 für den Transport verantwortlichen Proteindomänen, die Trägerproteine, in der Regel unverändert blieben. Daraus wird deutlich, daß Systeme, in denen Passagier- und Trägerkomponente unmittelbar benachbart oder in einem Gen kodiert vorliegen, sogenannte Ein-Komponenten-Systeme, einen erheblichen
20 Vorteil gegenüber Systemen mit mehreren, unabhängigen Komponenten (Gentschev et al., Behring Inst. Mitt. 95 (1994) 57 - 66) haben, insbesondere bei der Herstellung von universell verwendbaren Vektoren, die neben der Eigenschaft zur stabilen Replikation, einem oder mehreren Selektionsmarkern, den für
25 den Transport notwendigen Proteindomänen, auch eine Insertionsstelle für das den Passagier kodierende DNA-Fragment enthalten müssen. Als Trägerproteine in vielen bisher verwendeten Ein-Komponenten-Systemen wurden Proteine der äußeren Membran von E. coli verwendet. Dazu gehören unter anderem
30 LamB (Charbit et al., Gene 70 (1988), 181 - 189), PhoE (Agterberg et al., Gene 59 (1987) 145 - 150) oder OmpA (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717), deren Verwendung jedoch Nachteile bergen. So können zusätzliche Proteinsequenzen nur in oberflächenexponierten Schleifen integriert werden, was einmal zu fixierten amino- und
35 carboxyterminalen Enden an den einrahmenden Trägerproteinsequenzen führt und zum anderen sich limitierend auf die Länge

der einzubringenden Sequenzen auswirkt. Die Verwendung des Peptidoglykan assoziierten Lipoproteins (PAL) als Trägerprotein führt zwar zum Transport zur äußeren Membran, eine Präsentation nativer Proteinsequenzen auf der Oberfläche von E.coli ist damit jedoch nicht möglich (Fuchs et al., Bio.Technology 9 (1991), 1369 - 1372). Eine Oberflächenexpression größerer Proteine ist möglich unter Verwendung einer Fusion aus OmpA und Lpp als Trägerproteinanteil, an deren Carboxylende die Passagierproteinsequenzen angehängt werden (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717). Dabei ist als Nachteil in Kauf zu nehmen, daß die Fixierung des N-Terminus des Passagiers eine korrekte Faltung oder Funktion verhindern kann.

Weiterhin sind sogenannte Autotransporter enthaltende Proteine bekannt, eine Familie von sekretierten Proteinen in Gram-negativen Bakterien. In der Publikation Jose et al. (Mol.Microbiol. 18 (1995), 377-382) werden einige Beispiele für solche Autotransporterproteine genannt. Diese Proteine enthalten eine Proteindomäne, die den Transport einer N-terminalen angehängten Proteindomäne durch eine aus β -Faltblattstrukturen gebildete Porenstruktur in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien ermöglicht. Die Autotransporter enthaltenden Proteine werden als sogenanntes Poly-Protein-Vorläufermolekül synthetisiert. Der typische Aufbau eines solchen Vorläuferproteins ist dreigeteilt. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, die verantwortlich ist für den Transport durch die innere Membran, unter Inanspruchnahme des im Wirt vorhandenen Sec-Transportapparates und die dabei abgetrennt wird. Daran schließt sich die zu sekretierende Proteindomäne an, gefolgt von einer C-terminalen Helferdomäne, die eine Pore in der Außenmembran bildet, wodurch die N-terminal angehängte zu sekretierende Proteindomäne an die Oberfläche transloziert wird. Dort bleibt diese in Abhängigkeit ihrer auszuübenden Funktion mit dem nun als Membrananker dienenden Helfer an der Bakterienoberfläche verbunden oder wird durch proteolytische Aktivität abgetrennt, wobei diese pro-

teolytische Aktivität der zu sekretierenden Proteindomäne innewohnen kann oder eine vom Wirt ausgehende Eigenschaft sein kann oder eine externe/gezielt zugesetzte Aktivität (z.B. Thrombin, IgA-Protease) sein kann. Die Sekretion heterologer Polypeptide bzw. Proteine unter Verwendung eines auf einem Autotransporter basierenden Expressionssystems ist bekannt. So ist beispielsweise aus EP-A-0 254 090 oder der Publikation Klauser et al. (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) bekannt, daß die Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* heterologe Polypeptide als Passagierdomänen in den heterologen Bakterienstämmen *E.coli* und *Salmonella typhimurium* exprimieren kann.

Weiterhin ist der extrazelluläre Transport des Proteins VirG von *Shigella* bei Suzuki et al. (J.Biol.Chem. 270 (1995), 30874-30880) beschrieben. Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um einen IgA-Protease-ähnlichen Autotransporter, der zur Expression fremder Polypeptide wie etwa MalE und PhoA in der Lage ist, die kovalent an den N-Terminus der Autotransporterdomäne von VirG verknüpft wurden. Weiterhin wird in der Arbeit Shimada et al. (J.Biochem. 116 (1994), 327-334) der extrazelluläre Transport eines heterologen Polypeptids, nämlich Pseudoazurin aus *A. faecales* in *E.coli* unter Verwendung der Autotransporterdomäne der Serinprotease von *S. marcescens* beschrieben.

Bei den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung zur Expression heterologer Passagierproteine mit Hilfe von Autotransportersystemen wurden jedoch erhebliche Nachteile festgestellt. So treten bei Verwendung der Transporter- bzw. Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* in *E.coli* als Wirtstamm häufig erhebliche Kompatibilitätsprobleme auf. Zu starke Expression führt zur Zell-Lyse oder die Bakterien zeigen ein vermindertes Wachstum auch bei mittlerer Expression, was in beiden Fällen zu einer erheblich verminderten Fusionsproteinausbeute führt und auf Schwächen in der Stabilität des Systems hinweist. Der vorliegenden Erfindung

lag also das technische Problem zugrunde, Trägerproteine bereitzustellen, die insbesondere bei Verwendung von E.coli als Wirtsstamm nicht zu diesen Nachteilen führen, da aus vielerlei Gründen E.coli als Wirtsstamm gegenüber z.B. Neisseria gonorrhoeae vorzuziehen ist. Zum einen lassen sich E.coli Stämme mit rekombinanter DNA schon in einfachen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 anziehen. Darüberhinaus wird bereits mit E.coli Stämmen in der kommerziellen Produktion rekombinanter Proteine gearbeitet. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil im Umgang und in der Handhabung von rekombinanten E.coli Stämmen im Vergleich zu anderen Wirtsstämmen. Darüberhinaus gibt es von E.coli bereits eine große Anzahl genau charakterisierter Mutantenstämme, die in Abhängigkeit der gewünschten Anwendung eine Auswahl des Wirtsstammes zulassen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Polypeptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbakterien, wobei man,

- (a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:
 - (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungsstelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und
 - (v) einen für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt; und
- (b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Expression der fusionierten Nukleinsäuresequenz und eine Präsentation des von dem Nukleinsäureab-

schnitt (ii) kodierten Peptids oder Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

10 Durch die Verwendung eines Wirtsbakteriums, welches gegenüber dem für die Transporterdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, kann überraschenderweise eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Oberflächenpräsentation von Peptiden oder und Polypeptiden, insbesondere auch
15 von kurzen synthetischen Peptiden mit einer Länge von vorzugsweise 4 - 50 Aminosäuren bzw. von eukaryontischen Polypeptiden erreicht werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Wirtsbakterium bereitgestellt, das mit einem bzw. mit mehreren kompatiblen rekombinanten Vektoren transformiert ist. Ein solcher Vektor enthält in operativer Verknüpfung mit einem Promotor und gegebenenfalls weiteren für die Expression erforderlichen Sequenzen eine fusionierte Nukleinsäuresequenz. Diese fusionierte Nukleinsäuresequenz umfaßt (i) einen Signalpeptid-kodierenden Abschnitt, vorzugsweise einen Abschnitt, der für ein Gram-negatives Signalpeptid kodiert, welches den Durchtritt durch die innere Membran in das Periplasma ermöglicht. Weiterhin umfaßt die fusionierte Nukleinsäuresequenz (ii)
25 einen für das zu präsentierende Passagierpeptid bzw. Polypeptid kodierenden Abschnitt. Gegebenenfalls befindet sich 3'-seitig von diesem Abschnitt (iii) ein für eine Proteaseerkennungsstelle kodierender Nukleinsäureabschnitt. Beispiele für geeignete Proteaseerkennungsstellen sind Erkennungsstellen
30 für intrinsische, d.h. natürlicherweise in der Wirtszelle vorhandene oder extern zugeführte Proteasen. Beispiele für extern zugeführte Proteasen sind die IgA-Protease (vgl. z.B.

EP-A-0 254 090), Thrombin oder Faktor X. Beispiele für intrinsische Proteasen sind OmpT, OmpK oder Protease X. 3'-seitig von diesem Abschnitt befindet sich (iv) ein für einen Transmembranlinker kodierender Nukleinsäureabschnitt, der
s eine Präsentation des von Abschnitt (iii) kodierten Peptids oder Polypeptids auf der Außenseite der äußeren Membran des Wirtsbakteriums ermöglicht. 3'-seitig dieses Abschnitts ist ein für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierender Nukleinsäureabschnitt.

10

Besonders bevorzugt werden Transmembranlinkerdomänen verwendet, die homolog bezüglich des Autotransporters sind, d.h. die Transmembranlinkerdomänen werden von Nukleinsäureabschnitten direkt 5'-seitig der Autotransporterdomänen kodiert.
15 Die Länge der Transmembranlinker ist vorzugsweise 30 - 160 Aminosäuren.

Die Transporterdomäne ist in der Lage, in der Außenmembran des Wirtsbakteriums ein sogenanntes β -Faß auszubilden. Das
20 β -Faß besteht aus einer geraden Anzahl antiparalleler, amphipatischer, β -Faltblätter. Diese Struktur besitzt wie andere Proteine der Außenmembran Gram-negativer Bakterien am C-Terminus eine aromatische Aminosäure wie Phenylalanin oder Tryptophan. Darauf folgen abwechselnd geladene (polare) und un-
25 geladene (hydrophobe) Aminosäuren, eine Struktur, die eine Rolle bei der Faltung mit der Membran zu spielen scheint. Die Anzahl und Lage der amphipatischen, β -Faltblätter lassen sich mit Hilfe eines geeigneten Computerprogrammes identifizieren und mit Hilfe von Analogien zu den Außenmembranporinen, von
30 denen die Kristallstruktur bekannt ist (Cowan et al., Nature 358 (1992) 727 - 733), zur Konstruktion eines Modells der Faßstruktur verwenden. Vorzugsweise ist die Faßstruktur aufgebaut wie folgt: 9-14, insbesondere ca. 12 Aminosäuren (AS) für einen Membrandurchgang; keine oder eine minimale Anzahl
35 geladener AS zeigen in einem β -Faltblatt nach außen; kleine oder gar keine Schleifen zeigen nach innen, gegebenenfalls zeigen große oder sehr große Schleifen nach außen; das β -Faß

setzt sich aus 12, 14, 16 oder 18, insbesondere aus 14 anti-
parallelen β -Faltblättern zusammen.

Ausgehend von dem Modell des Fasses kann nun der für den
5 Selbsttransport durch die Außenmembran notwendige Bereich
festgelegt werden und mit einem Signalpeptid und einer Passa-
gierdomäne auf genetischer Ebene verknüpft werden. Die
Expression dieses Konstruktes ermöglicht dann den Transport
des Passagierproteins zur Bakterienoberfläche, wobei das Si-
10 gnalpeptid ursprünglich von dem Passagier oder einem anderen
Protein stammen kann. Dabei muß berücksichtigt werden, daß
zugehörig zu dem β -Faß eine in der Länge und Sequenz geeig-
nete Linkerregion mit verknüpft wird, die durch die gebildete
Pore durchreicht und dafür sorgt, daß die Passagierdomänen
15 vollständig an der Oberfläche exponiert sind.

Ein wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens
ist, daß das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transpor-
terdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, d.h.
20 die Wirtszelle und die Transporterdomäne werden aus homologen
Familien, z.B. Enterobakterien, vorzugsweise aus homologen
Gattungen, z.B. Escherichia, Salmonella oder Helicobacter,
besonders bevorzugt aus homologen Spezies, z.B. Escherichia
coli, Salmonella typhimurium ausgewählt. Besonders bevorzugt
25 werden Salmonella oder E.coli als Wirtsbakterium und eine
ebenfalls aus Salmonella oder E.coli stammende Transporterdo-
mäne oder eine Variante davon verwendet.

Als besonders geeigneter E.coli Wirtsstamm sei hier der Stamm
30 JK321 (DSM 8860) genannt, der ompT⁻, dsbA⁻ ist und den gene-
tischen Marker fpt trägt, was zu einer stabilen Oberflächen-
expression auch großer Proteine, wie z.B. der V_H-Kette eines
Antikörpers mit Hilfe des igaß-Helferproteins führt.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung daher ein Trägerprotein, das eine Autotransporter-
funktion ausübt, und eine Oberflächenexposition von rekombi-

nanten Proteine in *Escherichia coli* mit hoher Ausbeute ermöglicht. In einem typischen Beispiel handelt es sich dabei um den Autotransporter des "adhesin-involved-in-diffuse-adherence" (AIDA-I) aus *E.coli* (Benz und Schmidt, *Infect. Immun.* 57
5 (1989), 1506 - 1511). Die Transporterdomäne des AIDA-I-Proteins ist in Fig. 2 dargestellt. Neben dieser spezifischen Sequenz können auch Varianten davon verwendet werden, die beispielsweise durch Veränderung der Aminosäuresequenz in den nicht am Membrandurchgang beteiligten Schleifenstrukturen
10 erzeugt werden können. Gegebenenfalls können die für die Oberflächenschleifen kodierenden Nukleinsäureabschnitte auch vollständig deletiert werden.

Auch innerhalb der amphipatischen β -Faltblattstrukturen können
15 konservative Aminosäureaustausche, d.h. der Austausch einer hydrophilen durch eine andere hydrophile Aminosäure oder/und der Austausch einer hydrophoben durch eine andere hydrophobe Aminosäure vorgenommen werden. Vorzugsweise hat eine Variante eine Homologie von mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % zu der in Fig. 2 angegebenen Sequenz
20 der AIDA-I Autotransporterdomäne zumindest im Bereich der β -Faltblattstrukturen.

In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei dem
25 verwendeten Autotransporter um den des SepA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 123 - 135) oder eine Variante davon. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des IcsA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., *J. Bacteriol.* 175 (1993), 2189-2196) oder des Tsh-Proteins aus
30 *E.coli* (Provence et al., *Infect. Immun.* 62 (1994), 1369-1380). In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des Hsr-Proteins aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., *Mol. Microbiol.* 11 (1994), 349-361), des
35 Prn-Proteins aus *Bordetella ssp.* (Charles et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 3554-3558; Li et al., *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992), 1697-1705), des Ssp-Proteins aus *Serratia*

marcescens (z.B. Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944 oder Genbank-Accessionnr. X59719, D78380), des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae (StGeme et al., Mol. Microbiol. 14 (1994), 217-233), des BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect.Immunol. 62 (1994), 4727-4738), des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori (Schmitt und Haas, Mol.Microbiol. 12 (1994), 307-319) oder verschiedener Proteine aus Rickettsien (z.B. 190kDa Zelloberflächenantigene, Genbank-Accessionnr. M31227; SpaP, Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241; rOmpB, Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370 und Slp T, Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133) bzw. eine - wie vorstehend definierte - Variante davon.

- 15 Die DNA-Sequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der zuvor genannten Autotransporter sind in den Figuren 7-24 dargestellt.

Weitere Autotransporterdomänen in bakteriellen Oberflächenproteinen oder in sekretierten bakteriellen Proteinen können aus in Datenbanken vorliegenden Proteinsequenzen aus in Proteinsequenzen, die auf in Datenbanken verfügbaren DNA-Sequenzen basieren, oder aus durch Sequenzanalyse direkt oder indirekt über die DNA-Sequenz bestimmten Proteinsequenzen abgeleitet werden. Die entsprechenden kodierenden Regionen (Gene) können zur Herstellung von Vektoren oder Fusionsproteingenen, die eine effektive Oberflächenexpression von Passagierproteinen in Gram-negativen Bakterien, insbesondere E.coli ermöglichen, verwendet werden.

30

Oberflächenpräsentation bzw. -exposition bedeutet erfindungsgemäß, daß die Fusionsproteine bzw. Passagierdomänen auf der dem Medium zugewandten Seite der äußeren Bakterienmembran lokalisiert sind. Oberflächenexponierte Passagierproteine sind in intakten Gram-negativen Bakterien frei zugänglich für Bindungspartner.

In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung also die Oberflächenpräsentation von Peptiden oder in einer weiteren Ausführungsform die Oberflächenpräsentation von Peptidbibliotheken in Gram-negativen Bakterien, insbesondere in E.coli und deren Verwendung zur Bestimmung der Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor bzw. zur Epitopkartierung. Epitopkartierung bedeutet, daß das Peptid mit der höchsten Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor oberflächenexponiert auf dem produzierenden Stamm identifiziert wird. Dabei wird ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen (Makowski, Gene 128 (1993), 5 - 11) zur Expression von Peptidbibliotheken deutlich. In dem erfindungsgemäßen bakteriellen System erfolgt mit der Identifizierung eines die gewünschten Eigenschaften tragenden Peptides gleichzeitig die Selektion des klonalen Produzenten. Dieser kann unmittelbar vermehrt werden und zur Produktion größerer Mengen des gewünschten Peptides verwendet werden, ohne daß wie im Phagensystem aufwendige Zyklen von Infektion (Phagenvermehrung) und Selektion (Phagenauswahl) notwendig sind. Gleichzeitig mit der Vermehrung des das korrekte Peptid oberflächenexponiert exprimierenden Stammes erfolgt eine Amplifikation des entsprechenden kodierenden Gens, dessen Sequenzanalyse eine eindeutige Identifizierung und Charakterisierung des Peptids mit einfachen und etablierten Techniken erlaubt. Diese erfindungsgemäßen Vorteile treffen auf alle mit der vorliegenden Erfindung oberflächenexponiert exprimierten Passagierdomänen, d.h. Peptide und Polypeptide zu.

Eine erfindungsgemäß hergestellte Peptidbibliothek enthält also Fusionsproteine, zusammengesetzt aus einem Autotransporter, in einer besonders bevorzugten Variante aus dem AIDA Autotransporter, und einem Peptid, das in einem Gram-negativen Bakterium, bevorzugt E.coli oberflächenexponiert produziert wird. Die hohe Varianz an verschiedenen exprimierten Peptiden ergibt sich in einem typischen Beispiel durch die Klonierung von degenerierten, synthetisch hergestellten Oli-

gonucleotiden zwischen die kodierenden Regionen für das Signalpeptid und den Autotransporter.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Expression von als Antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, bevorzugt von E.coli. Die Konstruktion eines derartigen Fusionsproteins erfolgte erfindungsgemäß unter Verwendung der β -Untereinheit des Toxins von *Vibrio cholerae* (CtxB) als Passagier und dem AIDA Autotransporter als Trägerprotein. Die Zugänglichkeit der oberflächenexponierten antigenen Domänen für in Frage kommende Bindungspartner wurde erfindungsgemäß nachgewiesen durch Markierung mit einem für CtxB spezifischen Antiserum. Dabei zeigte sich, daß die rekombinanten, in die Außenmembran des E.coli Wirtstammes eingelagerten Fusionsproteine bis zu 5 % des Gesamtzellproteins ausmachen können, was eine erheblich verbesserte Effizienz im Vergleich zu anderen Systemen bedeutet. Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht somit die stabile Produktion und Präsentation von antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien und in einer bevorzugten Ausführungsform deren Verwendung als Lebendvakzine, zur oralen Vakzinierung oder zum Screening von Seren oder Antikörperbanken. Die Verwendung von Bakterienzellen, beispielsweise attenuierten *Salmonella* Stämmen (Schorr et al., Vaccine 9 (1991) 675-681), mit oberflächenexponiert exprimierten antigen wirkenden Proteinen hat sich bei der Lebendvakzinierung als vorteilhaft gegenüber der intrazellulären bakteriellen Expression von Antigenen erwiesen.

Generell erlaubt die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Oberflächenexpression aller Passagiere, die in ihrem wesentlichen Bestandteil Peptide oder Proteine sind auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, insbesondere E.coli.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dient die C-terminale Domäne des AIDA Proteins, der AIDA Autotransporter, als Membrananker zur Präsentation rekombinanter Polypeptide des Immunsystems, z.B. rekombinanter Antikörperdomänen auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien. Die Oberflächenexpression von rekombinanten Antikörperfragmenten ermöglicht deren rasche Modifizierung wie auch die Bewertung und Untersuchung ihrer Antigen-bindenden Eigenschaften. So wird es möglich ganze Bibliotheken von funktionellen Antikörperfragmenten oberflächenexponiert zu produzieren und auf bestimmte vorgegebene Bindungseigenschaften oder Affinitäten hin zu testen. Der Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen liegt darin, daß die Variation, d.h. die genetische Manipulation und die Produktion des Proteins in demselben Wirtsorganismus erfolgen kann. Dabei kann die genetische Manipulation eine gezielte sein (ortsspezifische Mutagenese) oder eine zufällige, unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden zur Synthese einer intakten Fusion aus Antikörper-kodierendem Fragment als Passagier und dem Autotransporter als Trägerprotein. Ebenso kann die genetische Manipulation in Form von in vivo-Mutagenese erfolgen, indem man die Bakterien, die das Gen für das Fusionsprotein enthalten, energiereicher Strahlung (z.B. UV) oder chemischen, mutagen wirkenden Agenzien aussetzt.

25

Die erfindungsgemäße Selektion des Moleküls mit den korrekten Bindungseigenschaften geht einher mit der Selektion der produzierenden Bakterienzelle. Daraus wird ersichtlich, daß diese erfindungsgemäße Verfahrensweise in ihrer Strategie bestehend aus Variation und nachfolgender Selektion der natürlichen Strategie des Immunsystems zur bestmöglichen Anpassung von Bindungseigenschaften immunogener Moleküle angelehnt ist. Zur Expression funktioneller Antigen-bindender Teile von Antikörpern, die gewöhnlich nicht glykosyliert werden, auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, vorzugsweise E.coli sind verschiedene erfindungsgemäße Vorgehensweisen denkbar. Zwei monovalente Fragmente können zusammen präsen-

tiert werden durch getrennte Fusionen der leichten Kette (VL) und der schweren Kette (VH) mit jeweils einer Autotransporterdomäne, die unabhängig voneinander mit verschiedenen kompatiblen Vektoren oder unter Kontrolle verschiedener Promotoren auf dem gleichen Vektor in einer Wirtszelle exprimiert werden. Auf der Oberfläche lagern sich beide oberflächenexponiert vorliegenden Antikörperdomänen zu einem funktionellen Fv-Fragment zusammen, wobei die Stabilität der Interaktion durch eine chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung oder anders geartetes chemisches cross-linking gefördert werden kann.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden Fusionsproteine hergestellt, die den Autotransporter als Trägerprotein enthalten, und als Passagier die leichte Kette (VL) und die schwere Kette (VH) einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers, verknüpft über ein kurzes Linker-Peptid (z.B. [Gly₄Ser]₃), das eine korrekte Zusammenlagerung der beiden Ketten zu einem funktionellen Fv-Fragment erlaubt. Bei der Konstruktion solcher single-chain (sc) Fv-Fragmente ist sowohl eine Verknüpfung des N-Terminus der leichten Kette mit dem C-Terminus der schweren Kette, wie auch eine Verknüpfung des N-Terminus der schweren Kette mit dem C-Terminus der leichten Kette möglich (Pluckthun Immun. Rev. 130 (1992), 151 - 188). Mit den beschriebenen Vorgehensweisen ist auch die Produktion eines kompletten Fab-Fragmentes möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die oberflächenexponierte Expression von MHC-Klasse II Molekülen in E.coli gegebenenfalls mit definierten eingelagerten Peptiden. Dabei sind zwei Strategien denkbar. In der einen Variante werden zwei verschiedene Fusionsproteine, die beide einen Autotransporter als Trägerprotein enthalten, auf getrennten kompatiblen Vektoren oder auf einem Vektor unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren in einer Wirtszelle exprimiert. Als Passagierprotein dient einmal die α -Kette des gewünschten MHC-Klasse II Subtyps und zum

anderen die β -Kette dieses Subtyps, an deren N-Terminus über einen Linker das gewünschte Peptid angehängt sein kann (Kozono et al., Nature 369 (1994) 151-154).

- 5 In der zweiten Variante wird ein Passagierprotein bestehend aus dem Peptid, der β -Kette und der α -Kette mit einem Auto-transporter fusioniert. Auf der Bakterienoberfläche lagern sich die α - und β -Kette zu einem funktionellen MHC-Molekül zusammen, wobei das Peptid sich korrekt in die Bindungsgrube
10 einlagert. Die Stabilität des Komplexes kann durch chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung unterstützt werden. Die Variation des eingelagerten Peptides ist möglich durch ortsspezifische Mutagenese oder/und durch den Einsatz von degenerierten Oligonukleotidprimern bei der Herstellung der die
15 Fusionsproteine kodierenden DNA-Fragmente, ebenso wie durch in vivo-Mutagenese Methoden unter Verwendung von energiereicher Strahlung oder/und chemischen Mutagenen.

Auch hier wird noch einmal der Vorteil des erfindungsgemäßen
20 Verfahrens deutlich. Variation des Bindungspartners, Expression, Selektion des Moleküls mit den optimalen Eigenschaften, Sequenzanalyse und stabile Produktion kann in einem Wirtstamm erfolgen. Damit wird beispielsweise auch eine rasche Charakterisierung von Varianten bereits bekannter Liganden mit bes-
25 seren Bindungseigenschaften möglich und damit eine Liganden- oder Rezeptoroptimierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Oberflächenexpression von immunmo-
30 dulatorischen Rezeptoren wie beispielsweise CD1, Fc-Rezeptor oder MHC-Klasse I Molekülen, sowie deren gezielte Variation.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Oberflächenexpression von T-Zellrezeptoren oder Teilen davon, aber auch von weiteren Oberflächen-
35 antigenen eukaryontischer Zellen oder Zellen des Immunsystems.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die oberflächensexprimierten Proteinfragmente oder Peptide T-Zellepitope, die im Anschluß an die Aufnahme der Bakterien durch adäquate Zelllinien oder Primärzellen, wie z.B. Makrophagen als in MHC-Moleküle der Klasse I oder II eingelagerte Peptide präsentiert werden und zur Stimulation spezifischer T-Zellen dienen können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Oberflächenexpression und die Variation eines Peptids oder Polypeptids mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, eines Liganden, eines Rezeptors, eines Antigens, eines Toxin-bindenden Proteins, eines Proteins mit enzymatischer Aktivität, eines Nukleinsäure-bindenden Proteins, eines Inhibitors, eines Chelator-Eigenschaften habenden Proteins, eines Antikörpers oder einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers.

Unter dem Begriff "Bindungspartner" wird erfindungsgemäß ein Element, ein Molekül, eine chemische Verbindung oder ein Makromolekül verstanden, wobei der Bindungspartner und/oder die, die Fusionsproteine exprimierenden Bakterienzellen frei löslich, gebunden an eine Matrix oder aber assoziiert mit einer biologischen Membran vorliegen.

Der Begriff "Antigen bindende Domäne" bezeichnet erfindungsgemäß mindestens den Bereich eines Antikörpermoleküls, der hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung eine chemische, physikalische oder/und enzymatische Modifikation des oberflächensexponierten Passagierpeptids bzw. -polypeptids oder Teilen davon, wobei die Modifikation eine kovalente Modifikation, eine nicht-kovalente Modifikation, eine Glykosilierung, eine Phosphorylierung oder eine Proteolyse sein kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide bzw. Polypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, gliedert
s sich in folgende Schritte:

- (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der Transporterdomäne eines Autotransporters und eines Signalpeptides, wobei die einzelnen Teilfragmente über PCR amplifiziert oder aus Restriktionsverdauungen anderer DNA stammen können, in mindestens einen Vektor;
10
- (2) Variieren des Passagiers durch Mutagenese z.B. durch ortsspezifische Mutagenese, Verwendung von degenerierten Oligonukleotidprimern in der PCR, durch chemische Mutagenese oder durch Verwendung energiereicher Strahlung;
15
- (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien;
20
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in den Wirtsbakterien, die das Fusionsprotein oder die Fusionsproteine stabil an der Oberfläche präsentieren.
25
- (5) Kultivieren der Bakterien z.B. in Flüssigkultur oder auf Agarplatten zur Produktion des stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiere;
30
- (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen und
35
- (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.

Dabei kann erfindungsgemäß dieses Verfahren mehrmals durchlaufen werden, um die Eigenschaften des oberflächenexponierten Peptids bzw. Polypeptids schrittweise dem gewünschten Bindungsverhalten anzupassen oder in einem ersten Schritt den Bindungspartner bezüglich einer Eigenschaft zu optimieren und in einem zweiten Schritt bezüglich einer oder mehrerer anderer Eigenschaften. Erfindungsgemäß können aber auch in Abhängigkeit der gewünschten Anwendung auch nur einzelne Teilschritte des Verfahrens miteinander verknüpft werden, in einem typische Beispiel die Teilschritte (1), (3), (4) und (5), aber auch alle anderen möglichen Kombinationen.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens enthält das Fusionsprotein als Trägerprotein die Autotransporterdomäne des AIDA Proteins oder eine Variante davon, die eine Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens enthält das Fusionsprotein als Trägerprotein den SepA Autotransporter oder einen Teil davon, oder den IcsA Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Tsh Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Ssp Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hap Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Prn Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hsr Autotransporter oder einen Teil davon, oder den BrkA Autotransporter oder einen Teil davon, oder den VacA Autotransporter oder einen Teil davon oder einen Rickettsia-Autotransporter oder einen Teil davon, die jeweils die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglichen.

Die Expression multimerer Proteine wird erfindungsgemäß möglich durch Herstellung verschiedener Fusionsproteine in einer Zelle, die sich auf der Oberfläche zu einer funktionellen Einheit zusammenlagern.

Die geringe Generationszeit der als Wirtsorganismen verwendbaren Bakterien ermöglicht einen permanenten Zyklus von Variation und Selektion, der eine evolutionsartige Anpassung des Passagierpoteins, aber auch des Autotransporters an vorgegebene Eigenschaften ermöglicht. Dabei kann es sich in einem typischen Beispiel um Bindungsaffinitäten zwischen dem Passagierprotein und einem Bindungspartner handeln. Die Isolierung der Bakterien mit dem stabil exponierten Fusionsprotein erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner, z.B. einen Matrix-fixierten Bindungspartner, an einen Fluoreszenz-markierten Bindungspartner, einen Magnetpartikel-markierten Bindungspartner oder einen chromogen markierten Bindungspartner. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Bindungspartner so modifiziert, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner detektiert werden kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von stabil exprimierten Fusionsproteinen oder Teilen davon oder von Bakterien mit stabil auf der Oberfläche exprimierten Fusionsproteinen und deren Verwendung für therapeutische Zwecke oder diagnostische Zwecke, bei der Schadstoffanreicherung oder Entfernung, bei der Inaktivierung von Toxinen, bei der Rohstoffmobilisierung, bei der Lebensmittelherstellung oder -verarbeitung, bei der Waschmittelherstellung, bei der Markierung von ausgesuchten eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen. Erfindungsgemäß können Antikörper oder Antikörperfragmente stabil auf der Oberfläche exprimierende Bakterien, in einem typischen Beispiel unter Verwendung des AIDA Autotransporters als Transporterdomäne zur Produktion derselben verwendet werden, wobei diese Antikörper oder Antikörperfragmente anschließend, gegebenenfalls nach einer Aufreinigung für diagnostische oder therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Mit solchen Antikörpern oder Antikörperfragmenten wäre es beispielsweise möglich, Zellen mit

bestimmten Oberflächenmarkern, als typisches Beispiel seien hier Tumorantigene genannt, spezifisch zu bezeichnen oder zu selektionieren. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei den markierten Oberflächenmarkern um Rezeptoren, wobei die Markierung einhergeht mit der Blockierung der oder einer der Rezeptoreigenschaften, womit eine gezielte Inhibition einer durch den Rezeptor ausgelösten oder vermittelten Signaltransduktion und der damit verbundenen Zellfunktion möglich wird.

10

Beschreibung der Figuren

Figur 1:

Hydrophobizität der C-terminalen 300 Aminosäuren des AIDA-I Proteins.

Die für Autotransporter typische Pore in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien wird gebildet durch amphipatische β -Faltblattstrukturen, d.h. von Domänen mit β -Faltblattstruktur und alternierend hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. Dies kann man sichtbar machen, indem man einen relativen Hydrophobizitätswert der Aminosäure, der mittels eines bestimmten Algorithmus der Aminosäure zugeordnet wurde, gegen die Position der Aminosäure aufträgt. Es wurde der Algorithmus von Vogel und Jähnig (J. Mol Biol. 190 (1986) 191-199) verwendet. Die Pfeile zeigen die möglichen Membrandurchgänge an, wobei Pfeil nach links bedeutet, daß der Membrandurchgang von innen nach außen verläuft und Pfeil nach rechts Membrandurchgang von außen nach innen anzeigt. SP deutet eine relative Oberflächenwahrscheinlichkeit der Aminosäuren berechnet nach Emini et al. (J. Virol. 55 (1985), 836-839) an.

Figur 2:

Modell des Autotransporters aus dem AIDA-I Protein.

Ausgehend von der Auftragung der relativen Hydrophobizität einer Aminosäure gegen ihre Position (Figur 1) läßt sich die durch die antiparallelen, amphipatischen β -Faltblätter gebildete Faßstruktur als Modell darstellen. Die hier dargestellte

aufgeschnittene Faßstruktur, wird in der Membran durch Interaktion des ersten mit dem antiparallelen letzten Membrandurchgang geschlossen. Die in Rauten geschriebenen Aminosäuren befinden sich im Membranbereich, wobei fett umrandete relativ hydrophob sind und zur Außenseite des Faßes, also zur Membran hin orientiert sind, während dünn umrandete relativ hydrophil sind und mit ihren Seitenketten zur Innenseite der Pore hin zeigen. In Kreisen gezeichnete Aminosäuren bilden Schleifen außerhalb der Membran. Alanin an Position 1 des Modells trägt in der vollständigen Sequenz von AIDA-I die Nummer 1014, während das terminale Phenylalanin in der vollständigen Sequenz die Nummer 1286 trägt (Benz und Schmidt, Mol Microbiol 11 (1992), 1539-1546).

Figur 3 a:

Herstellung von pJM7, eines Vektors zur Oberflächenexpression von CtxB.

pJM7 enthält eine Genfusion (FP59) aus dem Choleratoxin B und der AIDA-Linker-/ β - Faß-Region. Diese Genfusion wird unter der Kontrolle des künstlichen Promotors PTK (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) in einem Vektor mit hoher Kopienzahl konstitutiv exprimiert. Das ctxB-Gen wurde mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 aus dem Plasmid pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) durch PCR amplifiziert. Der Autotransporter, bestehend aus dem β -Faß und der Linkerregion aus AIDA-I wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmid-DNA-Präparation von E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) amplifiziert. Das Oligonukleotid JM 1 enthält in seinem 5'-Überhang eine BglII-Erkennungssequenz, die Oligonukleotide JM6 und JM7 enthalten je eine KpnI-Erkennungssequenz. Die Vektor-DNA (pBA) wurde mit ClaI und BamHI hydrolysiert und die beiden PCR-Produkte wurden im Anschluß an die Amplifikation mit ClaI und KpnI (EF16/JM6-Fragment) bzw. mit BglII und KpnI (JM7/JM1-Fragment) nachgeschnitten. Die so generierten drei Fragmente wurden in einer Ligation kondensiert.

Figur 3 b:

Herstellung von pJM22, eines Vektors zur Oberflächenexpression von Peptiden.

pJM22 produziert das Fusionsprotein FP50, das aus drei Domänen besteht. Am N-terminalen Ende liegt die CtxB-Signalsequenz, die für den Export des entstehenden Fusionsproteins über die Zellmembran (Sec-vermittelt) sorgt. Daran anschließend folgt die Passagierdomäne, in diesem Fall ein Peptid, das Epitop PEYFK. C-terminal endet das Fusionsprotein mit der AIDA- β -Faß/Linker-Region, dem Autotransporter, welcher die N-terminal um das Signalpeptid verkürzte Passagierdomäne auf die Oberfläche von E.coli befördert. Zur Konstruktion von pJM22 wurde zunächst die DNA von pJM7 mit XhoI hydrolysiert und der Vektoranteil von pJM7 durch PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 amplifiziert. Dabei wurde das ctxB-Gen mit Ausnahme seiner Signalsequenz deletiert. Das Oligonukleotid JM20 enthielt in seinem 5'-Überhang zusätzlich zu der KpnI-Schnittsequenz fünf Codons, die für die Aminosäuren PEYFK kodieren. Diese Aminosäurenabfolge stellt ein lineares Epitop für den monoklonalen Antikörper Dü142 dar. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI hydrolysiert und anschließend mit sich selbst ligiert.

Figur 4

Expressionsnachweis und Proteasesensitivität.

Aufgrund der starken stabilen Expression der Fusionsproteine FP59 (von pJM7 aus) und FP50 (von pJM22 aus) in E.coli sind diese leicht in einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Ganzzelllysatz zu identifizieren. Proteasezugänglichkeit stellt ein übliches Mittel zur Bestimmung der Lokalisierung eines Proteins dar. Zu zelleigenen Proteinen ist nur dann Zugang zu erwarten, wenn diese auf der Außenseite der Bakterie präsentiert werden oder wenn die Außenmembran der Bakterie für Proteasen durchlässig wird. Um letzteres auszuschließen kann man einen Protease-sensitiven Marker benutzen, von dem bekannt ist, daß er natürlicherweise im Periplasma vorliegt. Nur wenn dieser nicht von der eingesetzten Protease angegriffen wird,

ist die Integrität der Außenmembran gewährleistet. Zellen von E.coli UT5600 bzw. JK321 wurden über Nacht auf LB-Agar (50 mg/l Ampicillin) angezogen und in PBS suspendiert. Die Zellsuspensionen wurde auf eine OD578 = 4,0 eingestellt. Zellen
5 von 0,5 ml Zellsuspension wurden 1 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 200 µl PBS mit 0,1 mg/ml Protease resuspendiert. Die Ansätze wurden 20 min bei 37° C inkubiert und durch Abkühlung auf 0° C, einminütiges Sedimentieren und Resuspendieren des Pellets in 40 µl SDS-PAGE-Probenpuffer und
10 sofortiges fünfzehnminütiges Kochen gestoppt. Die Auswertung erfolgte nach SDS-PAGE durch Western-Blotting (4b und 4c) oder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (4a). Um auszuschließen, daß die Proteasen Zugang zum Periplasma hatten, wurden nicht nur Antiseren, die spezifisch für die Passagier-
15 proteindomänen sind, eingesetzt sondern auch ein Antiserum spezifisch für den C-terminalen Teil von OmpA, der natürlicherweise unzugänglich im Periplasma vorliegt und deshalb durch extern zugesetzte Proteasen wie Trypsin nicht angreifbar sein sollte (4c).

20

Figur 4a:

SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue zum Nachweis der Proteasesensitivität und zur Quantifizierung der Expression. Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von
25 E.coli JK321 und E.coli UT5600.

Spur 1	JK321 pJM7 C *
Spur 2	JK321 pJM7 T**
Spur 3	JK321 pJM7 -***
30 Spur 4	Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und 14 kDa)
Spur 5	JK321 pJM22 C
Spur 6	JK321 pJM22 T
Spur 7	JK321 pJM22 -
35 Spur 8	JK321 pTK61 C
Spur 9	JK321 pTK61 T
Spur 10	JK321 pTK61 -

Spur 11 UT5600 pJM7 C
Spur 12 UT5600 pJM7 T
Spur 13 UT5600 pJM7 -
Spur 14 Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und
5 14 kDa)
Spur 15 UT5600 pJM22 C
Spur 16 UT5600 pJM22 T
Spur 17 UT5600 pJM22 -
Spur 18 UT5600 pTK61 C
10 Spur 19 UT5600 pTK61 T
Spur 20 UT5600 pTK61 -

C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut

T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut

15 *** native Zellen

Figur 4 b:

Western-Blot zum Nachweis der Expression und der Proteasesen-
sitivität

20 Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli
UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem
Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemem-
bran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklö-
sung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
25 und das erste Antiserum, AK55 (Kaninchen-Anti-Choleratoxin B)
1:200 in Blocklösung verdünnt, zugegeben. Zum Nachweis des
Epitops PEYFK wurde der Hybridom-Überstand Dül42 1: 35 ver-
dünnt in Blocklösung zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit den
primären Antikörpern inkubiert, anschließend dreimal gewa-
30 schen und 30 min mit ProteinA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat
(1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Die Filter wurden mit
NBT/BCIP-Färbelösung entwickelt.

Spur 1 JK321 pJM7 C *
35 Spur 2 JK321 pJM7 T**
Spur 3 JK321 pJM7 -***
Spur 4 Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und

	18 kDa)
Spur 5	JK321 pJM22 C
Spur 6	JK321 pJM22 T
Spur 7	JK321 pJM22 -
5 Spur 8	JK321 pTK61 C
Spur 9	JK321 pTK61 T
Spur 10	JK321 pTK61 -
Spur 11	UT5600 pJM7 C
Spur 12	UT5600 pJM7 T
10 Spur 13	UT5600 pJM7 -
Spur 14	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18 kDa)
Spur 15	UT5600 pJM22 C
Spur 16	UT5600 pJM22 T
15 Spur 17	UT5600 pJM22 -
Spur 18	UT5600 pTK61 C
Spur 19	UT5600 pTK61 T
Spur 20	UT5600 pTK61 -

- 20 C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut
 T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut
 -*** native Zellen

Figur 4 c:

- 25 Nachweis der Integrität der Außenmembran durch Western-Blot--
 Analyse.

Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli
 UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem
 Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemem-
 30 bran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklö-
 sung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
 und das erste Antiserum, K56 (Kaninchen Anti-OmpA) 1: 1000 in
 Blocklösung verdünnt, zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit
 dem primären Antiserum inkubiert, anschließend dreimal gewa-
 35 schen und 30 min mit Protein A Alkalische-Phosphatase-Konju-
 gat (1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Entwickelt wurden die
 Filter mit NBT/BCIP-Färbelösung. OmpA ist ein Außenmembran-

protein von E.coli mit einem C-terminalen periplasmatischen Anteil. Dieser periplasmatische Teil ist Trypsin-sensitiv. Wenn Trypsin Zugang zum Periplasma hat, wird vom reifen OmpA (35 kDa) ein circa 10 - 11 kDa großer Teil abgedaut. Ein Verdau würde also in einer Versetzung der OmpA-Bande im Western-Blot von 35 kDa nach 25 kDa resultieren (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999), was bei Verwendung des AI-DA-I Autotransporters zum Transport rekombinanter Proteine offensichtlich nicht der Fall ist

10

Spur 1	JK321 pTK1 T*
Spur 2	JK321 pJM7 T
Spur 3	JK321 pJM22 T
Spur 4	JK321 pTK61 T
15 Spur 5	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 6	JK321 pTK1 -**
Spur 7	JK321 pJM7 -
Spur 8	JK321 pJM22 -
20 Spur 9	JK321 pTK61 -
Spur 10	leer
Spur 11	UT5600 pTK1 T*
Spur 12	UT5600 pJM7 T
Spur 13	UT5600 pJM22 T
25 Spur 14	UT5600 pTK61 T
Spur 15	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 16	UT5600 pTK1 -**
Spur 17	UT5600 pJM7 -
30 Spur 18	UT5600 pJM22 -
Spur 19	UT5600 pTK61 -

T* Zellen wurden mit Trypsin verdaut

** native Zellen

35

Figur 5

Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ganzer, nicht permeabilisierter Zellen stellt eine übliche Methode des Nachweises auf der Zelloberfläche exponierter Determinanten dar. Die dabei zur Detektion der Determinanten eingesetzten Antikörper sind zu groß, um durch die intakte Außenmembran zu gelangen. Zur Unterscheidung und zur Abschätzung der Hintergrundaktivität von periplasmatisch oder zellulär exprimierten Determinanten benutzt man als Kontrolle Antikörper gegen bekanntermaßen periplasmatisch bzw. zellulär exprimierte Antigene.

10

Zellen von E.coli UT5600, die eines der Plasmide pBA, pTK1, pTK61, pJM7 oder pJM22 enthielten, wurden über Nacht auf LB-Agar (Ampicillin 50 mg/l) angezogen und in PBS bis zu einer optischen Dichte von 0,1 bei 578 nm suspendiert. Mit 500 µl dieser Zellsuspension wurden Deckgläser, die in 24 Loch-Mikrotiterplatten lagen, überschichtet. Die Zellen wurden 5 min in der Plattenzentrifuge auf die Deckgläser sedimentiert. 450 µl des Überstands wurden abgehoben und durch PBS mit 2,5% PFA (Paraformaldehyd) ersetzt, womit 20 min lang fixiert wurde. Der Überstand wurde gänzlich abgehoben und es wurde dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 5 min Inkubation mit 300 µl PBS, das 1% FCS enthielt, blockiert. Die Blockierungslösung wurde restlos abgehoben, die Deckgläser in ihren Vertiefungen zentriert, mit 15 µl einer 1:100 Verdünnung des Kaninchenserums AK55 (gegen Choleratoxin B entwickelt) bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen, 5 min mit 350 µl PBS/FCS blockiert und mit 15 µl einer 1: 100 Verdünnung eines Ziegen-Anti-Kaninchen-Texasrot-Konjugats 30 min inkubiert. Nach folgendem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser auf Objektträger gelegt und mit Einbettungsmedium eingebettet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz wurde mikroskopisch beurteilt und bei gleichlangen Belichtungszeiten fotografisch festgehalten.

35

- a) E.coli UT5600 pBA (als Negativkontrolle benutzter Stamm, der nur den Klonierungsvektor ohne Insert enthält)

- b) E.coli UT5600 pTK1 (produziert das Choleratoxin B, das ins Periplasma exportiert wird. Dieses Konstrukt dient zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des periplasmatisch exprimierten Choleratoxin B).
- c) E.coli UT5600 pJM7 (exprimiert FP59, das Fusionsprotein aus AIDA und Choleratoxin B, welches auf der Oberfläche von E.coli präsentiert wird).
- d) E.coli UT5600 pJM22 (exprimiert FP50, das Fusionsprotein aus AIDA und dem Epitop PEYFK. Mit diesem Konstrukt wird demonstriert, daß der AIDA-Anteil der FP59 und FP50 keine Kreuzreaktivität mit dem in diesem Experiment benutzten AK55 aufweist).
- e) E.coli UT5600 pTK61 (produziert ein Fusionsprotein aus Choleratoxin B und Iga- β , das auf der Oberfläche von E.coli präsentiert wird (Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999). Dient dem Vergleich mit dem AIDA--Konstrukt FP59).

Figur 6

DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide

Figuren 7-24

DNA-Sequenz (nicht-kodierender Strang) und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen von bakteriellen Autotransportern.

Figur 7

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von AIDA-I aus Escherichia coli (Benz und Schmidt, Mol.Microbiol. 6 (1992), 1539-1546).

Figur 8

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von BrkA aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect Immun. 62 (1994), 4727-4738).

Figur 9

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

transporters von Hap aus *Haemophilus influenzae* (StGeme et al., Mol.Microbiol. 14 (1994), 217-233).

Figur 10

- 5 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Hsr aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., Mol.Microbiol. 11 (1994), 349-361).

Figur 11

- 10 Darstellungen des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von IcsA aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., J.Bacteriol. 175 (1993), 2189-2196).

Figur 12

- 15 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (outer membrane protein P96) aus *Bordetella pertussis* (Charles et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86 (1989), 3554-3558).

20 Figur 13

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (P70, Pertactin) aus *Bordetella parapertussis* (Li et al., J.Gen.Microbiol. 138 (1992), 1697-1705).

25 Figur 14

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von dem 190 kDa cell surface antigen aus *Rickettsia rickettsii* (Anderson et al., unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. M31227).

30

Figur 15

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SpaP aus *Rickettsia prowazekii* (Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241).

35

Figur 16

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

transporters aus dem 120 kilodalton outer membrane protein (rOmp B) von *Rickettsia rickettsii* (Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370).

5 Figur 17

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SlpT aus *Rickettsia typhi* (Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133).

10 Figur 18

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SepA aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., Mol.Microbiol 17 (1995), 123-135).

15 Figur 19

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp aus *Serratia marcescens* RH1 (Rho, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. X59719).

20 Figur 20

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp von *S.marcescens* IFO-3046, clone pSP11 (Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944).

25 Figur 21

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h1 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. D78380).

30

Figur 22

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h2 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-

35 Accessionnr. D78380).

Figur 23

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Tsh aus *Escherichia coli* (Provence et al. 1994, *Infect.Immun.* 62 (1994), 1369-1380).

s Figur 24

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von VacA aus *Helicobacter pylori* (Schmitt und Haas, *Mol.Microbiol.* 12 (1994), 307-319). Von VacA sind noch mindestens 3 weitere Formen bei *Helicobacter pylori* bekannt,
10 die sich aber in dem angegebenen Bereich nicht wesentlich unterscheiden.

BEISPIELE

Beispiel 1:

5

Identifizierung und Lokalisierung des Autotransporters in einem Oberflächenprotein von *Escherichia coli*.

Um einen für die gewünschte Anwendung adäquaten Autotransporter, d.h. angepaßt an das Passagierprotein und den zu verwendenden Wirtsstamm, zu finden, ist es notwendig eine Analyse der C-terminalen Aminosäuresequenz eines in Frage kommenden Proteins durchzuführen. Dabei kann es sich um ein bereits als Oberflächenfaktor identifiziertes Protein handeln, aber auch
15 um eine in einer Datenbank abgelegte Aminosäuresequenz eines Proteins mit unbekannter Funktion, um eine von einer in einer Datenbank abgelegten DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins oder die im Anschluß an eine Sequenzanalyse von einem Gen abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins. Der N-Terminus des Proteins sollte eine Signalpeptidsequenz enthalten um einen Transport über die innere Membran zu ermöglichen und am C-Terminus sollte der in die Membran intergrierte Teil mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin oder Tryptophan beginnen, gefolgt von abwechselnd polaren
25 (oder geladenen) und hydrophoben (oder aromatischen) Aminosäuren. Die Passagierdomäne sollte wenig Cysteine und überhaupt keine Disulfidbrücken enthalten, da sich gezeigt hat, daß diese einen Transport des Passagiers durch die gebildete Pore blockiert. Der Hydrophobizitätsplot sollte eine gerade
30 Anzahl von amphipatischen β -Faltblattstrukturen anzeigen, aus denen sich die Außenmembranpore konstituiert. Die amphipatischen β -Faltblattstrukturen sollten ca. 12 Aminosäuren lang sein und ein Minimum an geladenen Aminosäuren zur Membranseite hin orientiert enthalten, wobei die die Membrandurchgänge verbindenden Schleifen zum Periplasma hin wenige Aminosäuren enthalten. Zur Außenseite (Medium) hin können
35 erheblich mehr Aminosäuren vorliegen. Daraus ergeben sich im

Hydrophobizitätsplot eine Zusammenlagerung der Membrandurchgänge in antiparallelen Paaren mit Ausnahme des ersten und des letzten Membrandurchgangs, die durch antiparallele Zusammenlagerung miteinander die Faßstruktur der Pore vollenden. Ausgehend von der Erfüllung dieser Kriterien läßt sich nun ein Modell des Autotransporters aufstellen, mit Hilfe dessen die Lage und Ausdehnung der für den Transport notwendigen Aminosäuren festgelegt werden kann. Zusätzlich zu den für die Pore notwendigen Aminosäuren muß für einen funktionsfähigen Autotransporter auch noch eine sogenannte Linkerregion, die vom periplasmatisch gelegenen N-Terminus der β -Faßstruktur durch die Pore an die Oberfläche verläuft, in das Fusionsprotein mitübernommen werden, damit die Oberflächenexposition aller Passagierdomänen vollständig gewährleistet ist.

Erstes Ziel der vorliegenden Erfindung war es ein System zur optimierten Oberflächenexposition rekombinanter Proteine in *E.coli* bereitzustellen. Deshalb wurde nach einem Autotransporter in einem natürlichen Oberflächenprotein von *E.coli* gesucht. Die Wahl fiel auf das Adhesin AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence, Benz und Schmidt Infect. Immun. 57 (1989) 1506-1511), dessen Sequenz in Datenbanken verfügbar war. Erfindungsgemäß zeigte sich eine Signalsequenz am N-Terminus von 49 Aminosäuren, während am C-Terminus die erfindungsgemäßen Vorgaben durch die Aminosäurenabfolge FSYKI (Phenylalanin-Serin-Tyrosin-Lysin-Isoleucin) erfüllt waren. Die transportierte Domäne enthielt keine Cysteine und durch den Hydrophobizitätsplot (Figur 1) wurden 14 antiparallele, amphipatische β -Faltblattstrukturen vorhergesagt. Somit sind für die Bildung der Pore mindesten die Aminosäuren von Alanin an Position 1014 der gesamten Aminosäuresequenz (Benz und Schmidt, Mol. Microbiol. 6 (1992) 1539-1546) bis zu Phenylalanin an Position 1286 notwendig (Figur 2). Als Linkerregion wurden zusätzlich Aminosäuren, die sich N-terminal an das Alanin 1014 anschließen ausgewählt. Die somit ausgewählte funktionelle Autotransporterregion konnte nun mittels PCR aus

der DNA des entsprechenden E.coli EPEC2787 isoliert werden und zur Konstruktion eines Fusionsproteins verwendet werden.

Beispiel 2:

- 5 Konstruktion eines oberflächenexponierten Fusionsproteins mit einer antigenen Determinante als Passagierprotein

Ausgehend von den Annahmen, daß es sich bei AIDA-I um einen Autotransporter handelt und daß eine Genfusion aus einem be-
10 liebigen Passagier und einem E.coli-eigenen Autotransporter (nämlich AIDA- β) für E.coli besser verträglich sein sollte als eine Genfusion desselben Passagiers mit einem heterologen Autotransporter (z.B. Iga- β) wurde eine Genfusion zwischen aida- β und einem Gen für ein Passagierprotein vorgenommen. Um
15 den Transport des Passagiers zu gewährleisten, wurde nicht nur AIDA- β sondern auch eine N-terminal vom β -Faß gelegene Verbindungsregion ("Linker") kloniert.

Als Passagier wurde CtxB ausgewählt und das entsprechende Gen
20 aus pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990), 1991-1999) mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 mittels PCR amplifiziert. Da AIDA-I Plasmid-kodiert in E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) vorliegt, wurde der AIDA-I Autotransporter mit Linkerregion ebenfalls durch PCR mit
25 den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmidpräparation von E.coli EPEC 2787 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, deren Erkennungssequenzen in den Oligonukleotiden enthalten waren. Die beiden so entstandenen Fragmente wurden in einen passend vorverdau-
30 ten Klonierungsvektor (pBA) mit hoher Kopienzahl kloniert. So entstand ein Konstrukt mit einem künstlichen konstitutiven Promotor (PTK; Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) vor einer Genfusion bestehend aus ctxB am 5'-Ende (kodierend für die Aminosäuren 1-113), gefolgt von einem AIDA-I Linker
35 (kodierend für die Aminosäuren 116-279 des Fusionsproteins) und dem AIDA-I Autotransporter (kodierend für die Aminosäuren 280-563 des Fusionsproteins) am 3'-Ende (Figur 3a). Die ent-

standene Genfusion wurde FP59 benannt.

Die verglichen mit dem bisher existierenden System Iga- β substantiell stärkere Expression, die ohne die bei Iga- β zu beobachtende Neigung zur Lyse erzielt wurde, konnte eindeutig durch vergleichende Elektrophorese von Ganzzell-Lysaten (Figur 4a) demonstriert werden.

Der Nachweis der Oberflächenexposition von FP59 wurde durch verschiedene Methoden geführt. Die Proteasesensitivität von FP59 zeigte sich im Protein-Gel durch eine Verringerung des Molekulargewichts im Anschluß an einen Zusatz von Trypsin oder Chymotrypsin (Figur 3a). Es entstanden Protease-resistente Fragmente mit jeweils circa 33-35 kDa Masse (Figur 3a). Diese Protease-resistenten Fragmente enthalten keine immunogenen Anteile des Passagierproteins. Dies konnte durch Western-Blot-Analyse von Ganzzell-Lysaten unter Verwendung eines Anti-Cholera-toxin B Serums im Vergleich von Protease-verdauten und unverdauten FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Figur 4b und Vergleich von 4a und 4b).

Durch N-terminale Ansequenzierung der membrangeschützten Trypsinverdauungsprodukte wurde gefunden, daß die Membranlinkerregion beim AIDA-Autotransporter eine Länge von 55 Aminosäuren besitzt.

Mit den Proteaseverdauungen konnte auch die Integrität der Außenmembran von FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Abb. 4c). Dazu wurden Ganzzell-Lysate im Anschluß an den Verdau mit Trypsin durch Immunoblot mit einem Anti-OmpA-Serum entwickelt. Sowohl unverdaute Zellen als auch trypsinverdaute Zellen zeigten ein intaktes OmpA, wie es für Zellen mit einer intakten Außenmembran zu erwarten war.

Auch mit Immunfluoreszenzstudien ließ sich die Oberflächenexposition und starke Expression von FP59 zeigen (Figur 5). Durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern läßt sich

die Oberflächenexposition eines Antigens auf einer Bakterienzelle bei intakter Außenmembran nachweisen. Dies zeigten FP59 exprimierende E.coli-Zellen durch starke Fluoreszenz an. Die als Negativkontrollen verwendeten E.coli Zellen mit periplasmatisch exprimiertem Cholera-toxin B, mit oberflächenexponiertem FP50 (Figur 3b) und mit nichtrekombinantem Klonierungsvektor waren eindeutig negativ. Das periplasmatische Cholera-toxin B demonstrierte die Unzugänglichkeit des Periplasmas für Antikörper (Figur 5b), durch das negative Resultat der Immunfluoreszenz mit FP50 konnte eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antiserums (gegen das Passagierprotein) mit den AIDA-Anteilen von FP59 ausgeschlossen werden (Figur 5d). Die Immunfluoreszenz mit dem nichtrekombinanten Klonierungsvektor war ein Maß für die der Meßmethode innewohnende Hintergrundfärbung (Figur 5a). Außerdem war somit ein Vergleich der Expression von FP59 mit B61, dem von pTK61 produzierten, oberflächenpräsentierten Cholera-toxin B-Iga- β -Fusionsprotein möglich (Figuren 5c und 5e), wobei ebenfalls ein eindeutiger Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Systems nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 3:

Konstruktion einer oberflächenpräsentierten Peptidfusion

Ein Peptid, das als lineares Epitop für einen monoklonalen Antikörper (Dü142) fungiert, wurde auf der Oberfläche präsentiert und nachgewiesen. Zur Klonierung des Peptids wurde eine PCR-abhängige Strategie benutzt, die für die Generierung und Oberflächenexposition von Peptidbibliotheken äußerst geeignet ist. Dabei wird eine dreifache Genfusion aus dem Exportsignal von ctxB (Basen 1- 81), einer für ein Peptid kodierenden kurzen Sequenz (Basen 82-96) und der aida-linker/aida- β -Region (Basen 103-1450) gebildet.

pJM7 (Figur 3a) wurde mit XhoI linearisiert und als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 (Figur 6)

benutzt (Figur 3b). Beide Oligonukleotide wiesen an ihren 5'-Enden eine KpnI-Erkennungssequenz auf. JM7 wurde so gewählt, daß bei seiner Verwendung in einer PCR die aida-linker/aida- β -Domänen amplifiziert wurden. JM20 wurde so gewählt, daß im PCR-Produkt die in ctxB enthaltene Signalsequenz für den Sec-abhängigen Membrantransport über die Cytoplasmamembran und die sechs daran anschließenden Codons mit enthalten waren. Außerdem enthielt JM20 in seiner 5'-ständigen, nicht zur Matrize komplementären Verlängerung, fünf Codons, die für das lineare Epitop des Antikörpers D μ 142 kodierten. Stromaufwärts dieser Codons lag die KpnI-Erkennungssequenz. Nach der PCR wurde das resultierende Produkt mit KpnI hydrolysiert, mit sich selbst ligiert und anschließend in E.coli transformiert. Die Identifizierung korrekter Genfusionen wurde mittels Kolonie-Immunoblot vorgenommen (ohne Figur). Der Nachweis der Expression und der Oberflächenexposition wurde in Analogie zu den in Beispiel 2 beschriebenen Methoden durch Western-Blot-Analyse von Proteaseverdauungen und Analyse von Proteinfärbungen im Gel (Figuren 4a,b,c) geführt.

Die Generierung umfassender Peptidbibliotheken ist durch eine geringfügige Änderung der hier beschriebenen Klonierungsstrategie machbar. Die für JM20 beschriebene Aufteilung der verschiedenen funktionellen Bereiche dieses Oligonukleotids muß dazu so geändert werden, daß der für das lineare Epitop kodierende Bereich durch einen Bereich ersetzt wird, der bei der Oligonukleotidsynthese gewollt der Degeneration unterworfen wird. Degeneration heißt, daß anstatt definierter Basen an allen Positionen dieses funktionellen Bereichs einzelne, mehrere, oder alle Basen durch ein Basengemisch aus bis zu vier verschiedenen Basen ersetzt werden. Dadurch kann jedes Codon anstatt für eine Aminosäure für bis zu 20 verschiedene Aminosäuren kodieren, wodurch ein Pool von kodierenden Sequenzen entsteht, die für alle denkbaren Kombinationen von Aminosäuren in einem Peptid der vorgegebenen Länge theoretisch möglich sind. Die Zelle, die das Peptid mit der ge-

wünschten Eigenschaft trägt kann nun vermittelt durch Bindung des oberflächenexponierten Peptids an einen Bindungspartner, der beispielsweise an eine Matrix immobilisiert vorliegt, Fluoreszenz-markiert ist oder an Magnetkugeln gekoppelt ist, isoliert werden und zur beständigen Produktion und Charakterisierung verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Poly-
peptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbak-
terien,

wobei man,

(a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert
mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung
mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäure-
sequenz lokalisiert ist, umfassend:

(i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäure-
abschnitt,

(ii) einen für das zu präsentierende Passagierpep-
tid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden
Nukleinsäureabschnitt,

(iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerken-
nungsstelle kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt,

(iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden
Nukleinsäureabschnitt und

(v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-
transporters kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt; und

(b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert,
bei denen eine Expression der fusionierten Nuklein-
säuresequenz und eine Präsentation des von dem Nu-
kleinsäureabschnitt (ii) kodierten Peptids oder
Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums
erfolgt,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die
Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die
Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
homolog ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der verwendete Autotransporter aus einer Gattung der
Enterobacteriaceae abgeleitet wurde und in einem Wirts-
bakterium einer Gattung der Enterobacteriaceae verwendet
wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Aida-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des SepA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des IcsA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Tsh-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Ssp-Proteins aus Ser-
ratin marcescens oder eine Variante davon verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Hsr-Proteins aus Hel-
icobacter mustelae, des Prn-Proteins aus Bordetella
ssp., des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae, des

BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis, des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori oder eines der Rickettsienproteine 190kDa Zelloberflächenprotein, SpaP, rOmpB oder SlpT, verwendet.

5

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere Peptide, insbesondere Peptide mit
einer Länge von 4-50 Aminosäuren präsentiert werden.

10

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere eukaryontische Polypeptide präsentiert werden.

15

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um einen Antikörper oder eine Antigen bindende Domäne eines Antikörpers handelt, wobei Antigen bindende Domäne mindestens
den Bereich eines Antikörpermoleküls bezeichnet, der
hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

20

12. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die α -Kette eines MHC Klasse II Moleküls handelt.

25

13. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette eines MHC-Klasse II Moleküls handelt.

30

14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette

35

eines MHC Klasse II Moleküls handelt, an dem N-terminal Aminosäuren angehängt vorliegen, die sich als Peptid in die Bindungsgrube des funktionellen MHC Moleküls einlagern können.

5

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß Bibliotheken von varianten Passagierpeptiden oder
-polypeptiden erzeugt, in Wirtszellen exprimiert und an
10 der Oberfläche präsentiert werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß die varianten Passagierpeptide oder -polypeptide in
15 einem konstanten Kontext eines Passagierpolypeptids präsentiert werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 16,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß eine Wirtsbakterienzelle unterschiedliche Passagierpeptide oder -polypeptide jeweils in Verbindung mit einer Transporterdomäne präsentiert.

18. Verfahren nach Anspruch 17,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß unterschiedliche Transporterdomänen in Verbindung mit unterschiedlichen Passagierpeptiden oder -polypeptiden verwendet werden.

30 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 - 18, weiterhin umfassend den Schritt des Selektionierens einzelner Passagierpeptide oder -polypeptide aus einer Bibliothek von varianten Peptiden oder Polypeptiden.

35 20. Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden oder Polypeptiden und zur Identifizierung der Bakterien, die Peptide bzw. Po-

lypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- 5 (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der Transporterdomäne eines Autotransporters und eines Signalpeptides in mindestens einen Vektor;
- 10 (2) Variieren des Passagierpeptids bzw. -polypeptids durch Mutagenese;
- (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien, die den Passagier oder die Passagiere
15 stabil an der Oberfläche präsentieren können,
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in den Wirtsbakterien;
- 20 (5) Kultivieren der Bakterien zur Produktion des stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiere;
- 25 (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen, und
- (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigen-
30 schaften.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei einzelne Schritte des Verfahrens weggelassen werden können.
- 35 22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Verfahren mehrmals durchlaufen wird.

23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei man die Transporterdomäne AIDA-I oder eine Variante davon verwendet.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 23, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Passagierprotein ein Peptid oder Polypeptid mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, ein Ligand, ein Rezeptor, ein Antigen, ein Toxin-bindendes Protein, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Nukleinsäure-bindendes Protein, ein Inhibitor, ein Chelator-Eigenschaften habendes Protein, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers ist.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 24, wobei die Identifizierung des Bakteriums, das einen Passagier mit einer gewünschten Bindungsaffinität oberflächenexponiert präsentiert, durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner erfolgt.
26. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Bindungspartner so modifiziert ist, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner detektiert werden kann.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 26, dadurch gekennzeichnet, daß Passagierproteine oder Teile davon auf der Bakterienoberfläche chemisch oder enzymatisch modifiziert werden.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine nicht-kovalente Modifikation ist.
29. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine kovalente Modifikation ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Glykosylierung ist.

31. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Phosphorylierung ist.

32. Verfahren nach Anspruch 27,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Proteolyse ist.

33. Verfahren nach Anspruch 32,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch intrinsische oder extern zugeführte Proteasen selektiv von der Bakterienoberfläche freigesetzt werden.

34. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine intrinsische Protease der Wirtszelle, insbesondere die OmpT-Protease, die OmpK-Protease oder die Protease X, freigesetzt werden.

35. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine extern zugeführte Protease, insbesondere die IgA-Protease, Thrombin oder Faktor X, freigesetzt werden.

36. Rekombinanter Vektor auf dem in operativer Verknüpfung

mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

(i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureab-

schnitt,

- (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid
oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nuklein-
säureabschnitt,
- 5 (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungs-
stelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nu-
kleinsäureabschnitt und
- (v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-
10 transporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt;

wobei der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für
die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt heterolog ist.

15

37. Rekombinantes Gram-negatives Wirtsbakterium,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einem Vektor nach Anspruch 36 transformiert
ist.

20

38. Wirtsbakterium nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß es gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) ko-
dierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

25

39. Wirtsbakterium nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine E.coli Zelle ist.

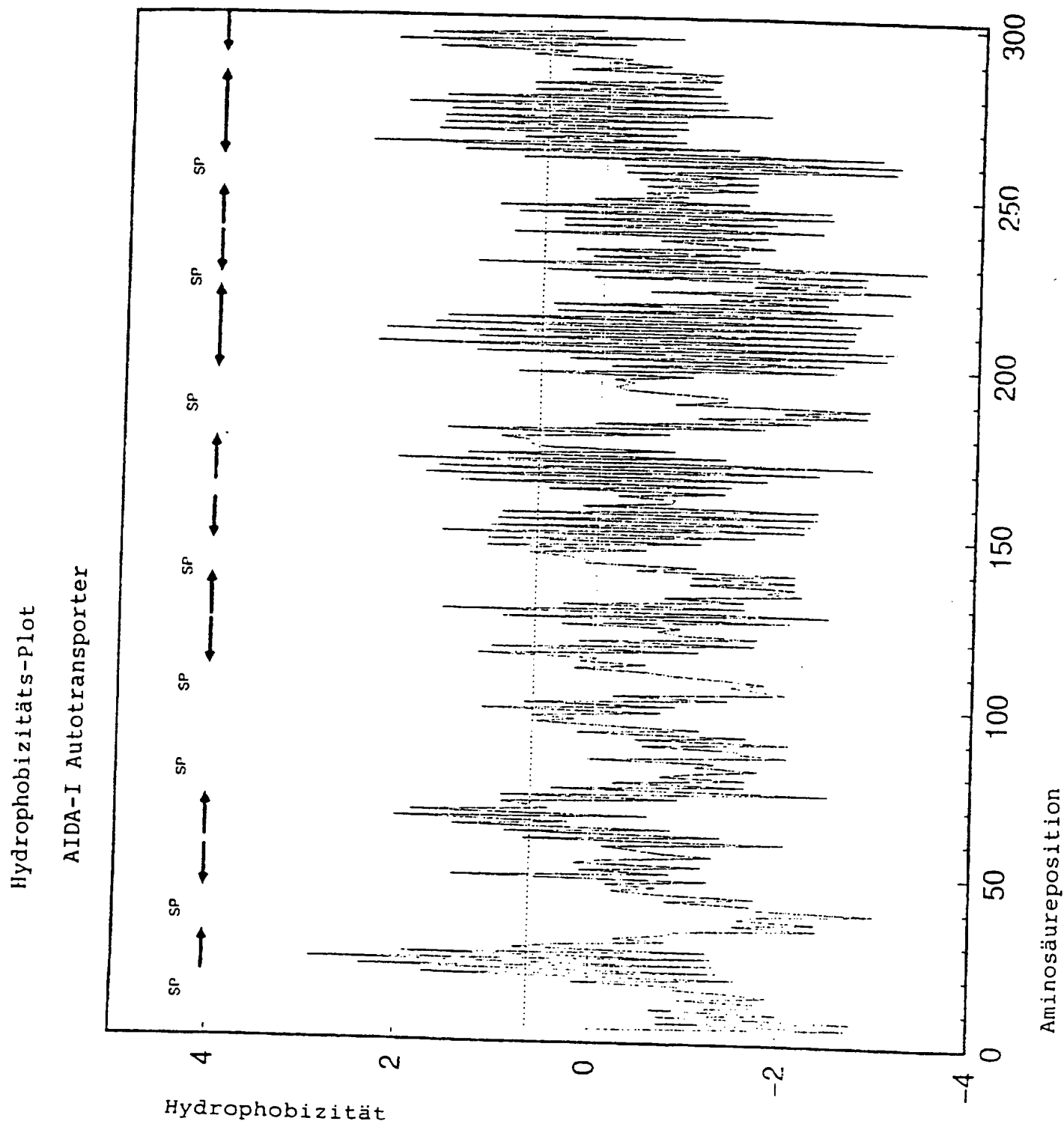
30

40. Wirtsbakterium nach einem der Ansprüche 37 - 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nukleinsäureabschnitt (v) für die Transporterdo-
mäne des AIDA-Proteins oder eine Variante davon kodiert.

35

1/20

Fig. 1



2/28

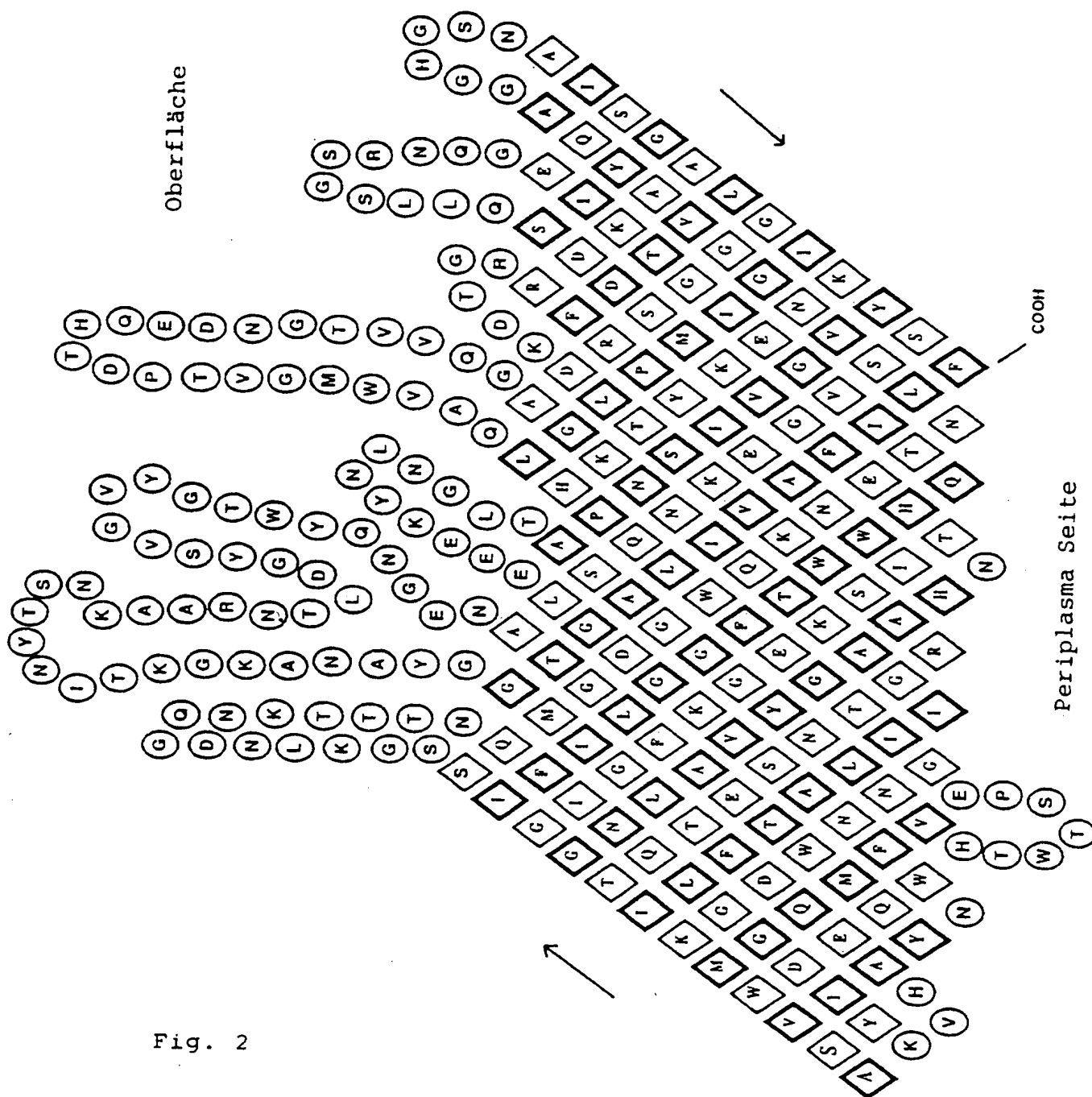


Fig. 2

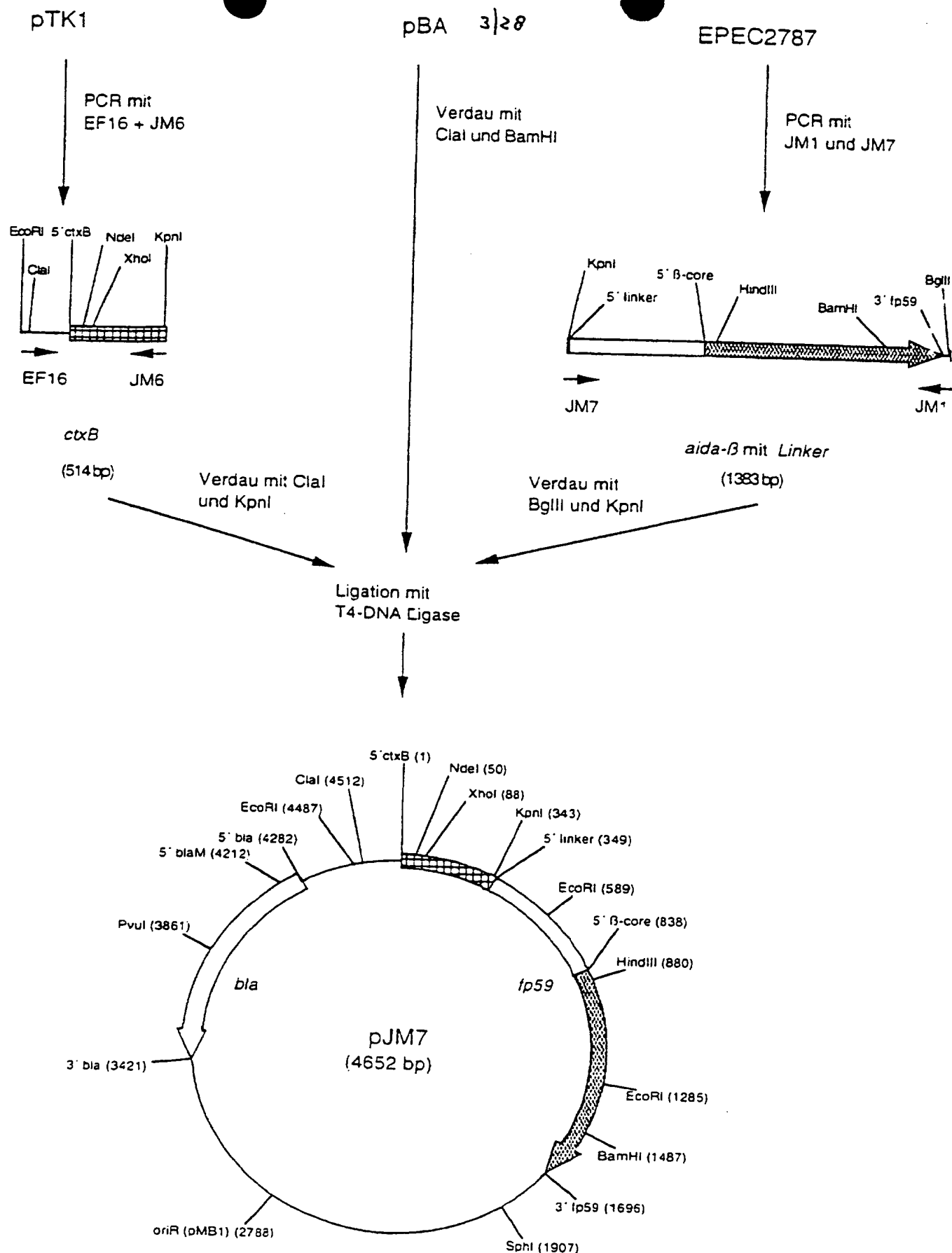


Fig. 3a

ERSATZBLATT (REGEL 26)

pJM7 4/28

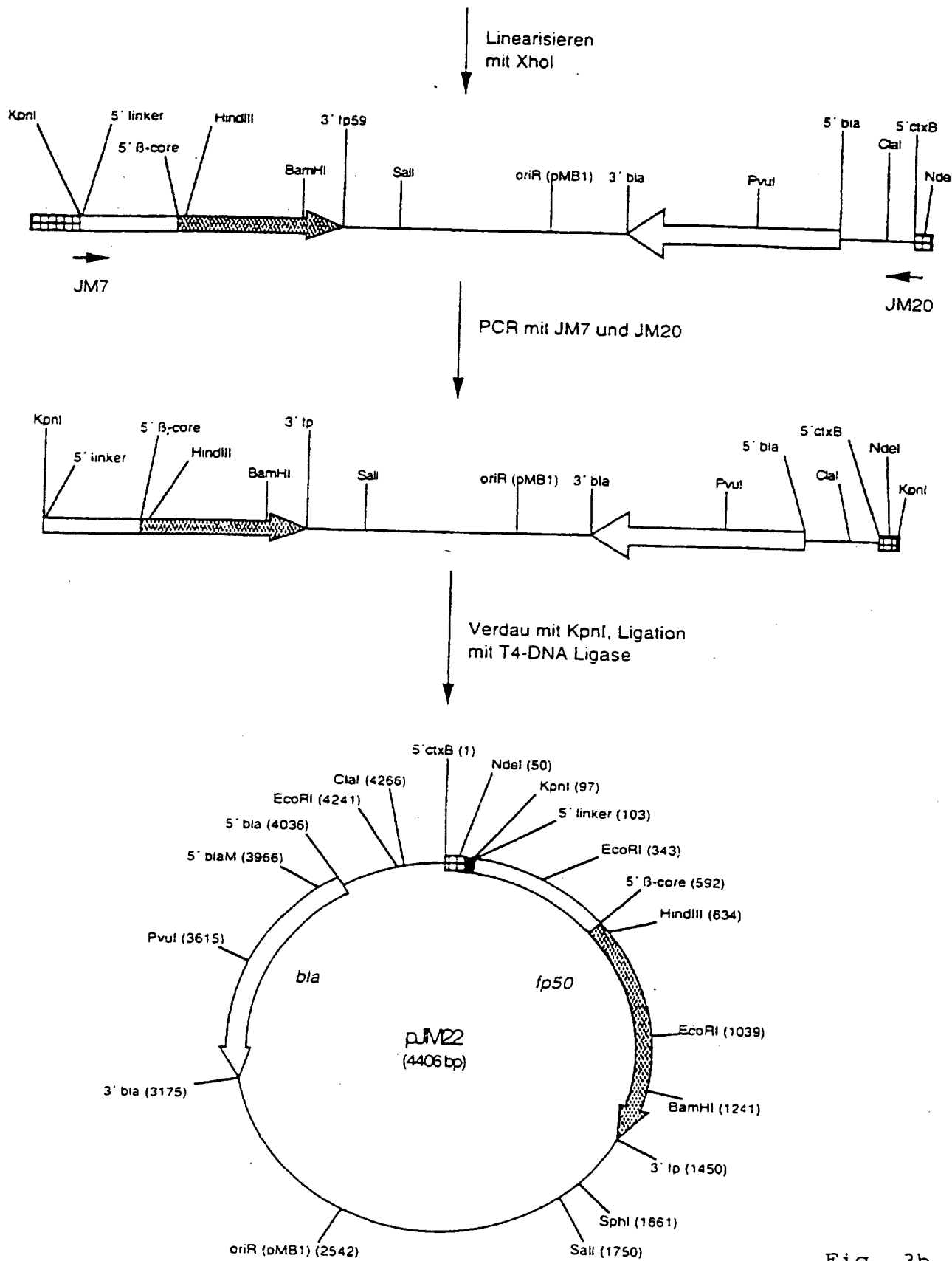
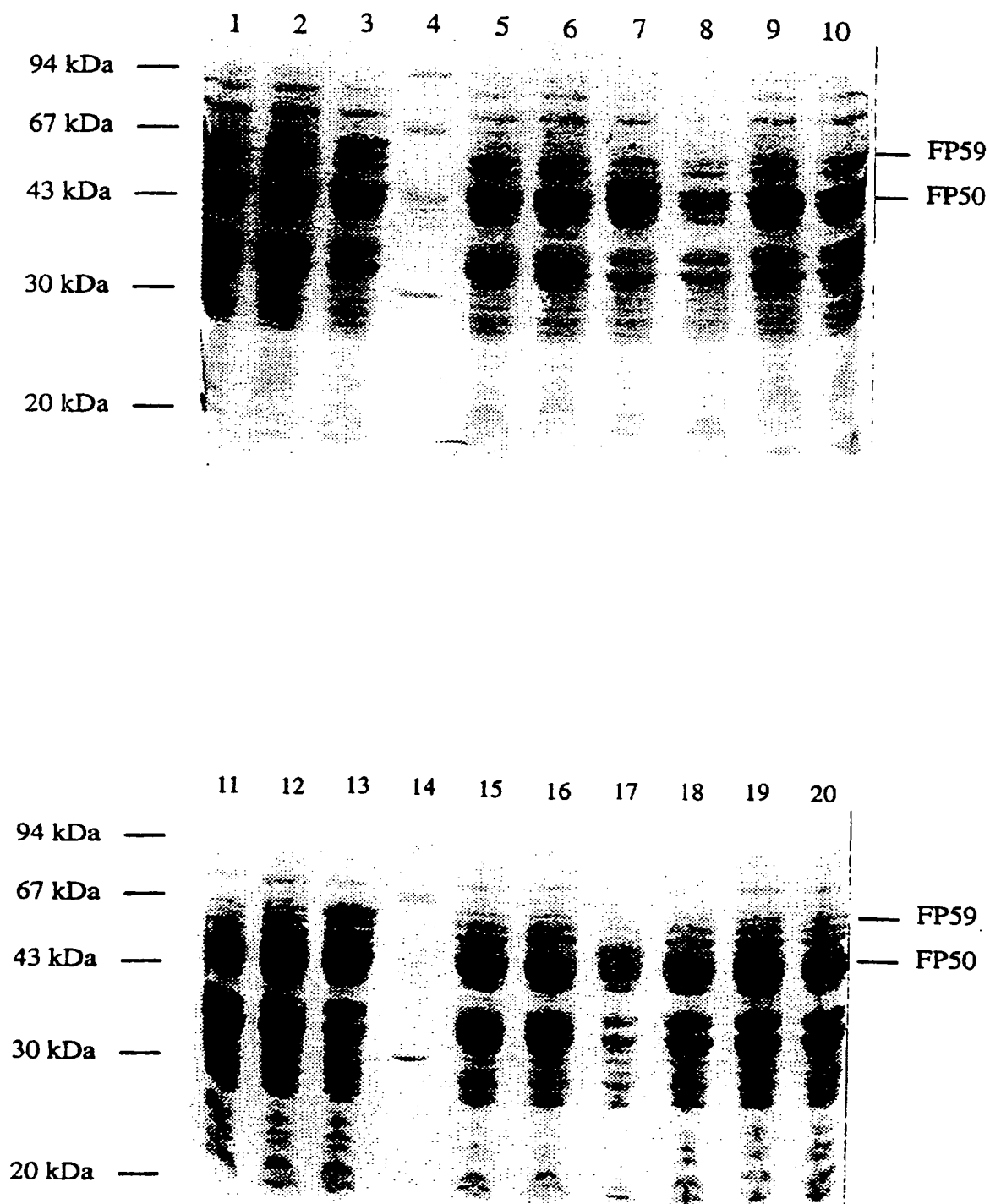


Fig. 3b

ERSATZBLATT (REGEL 26)

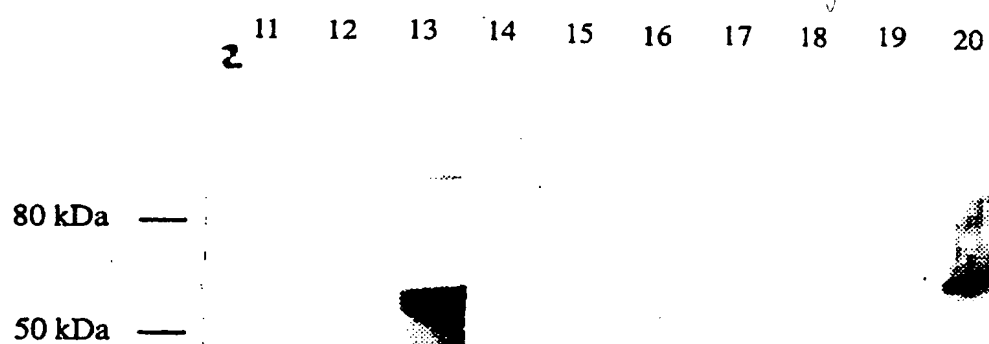
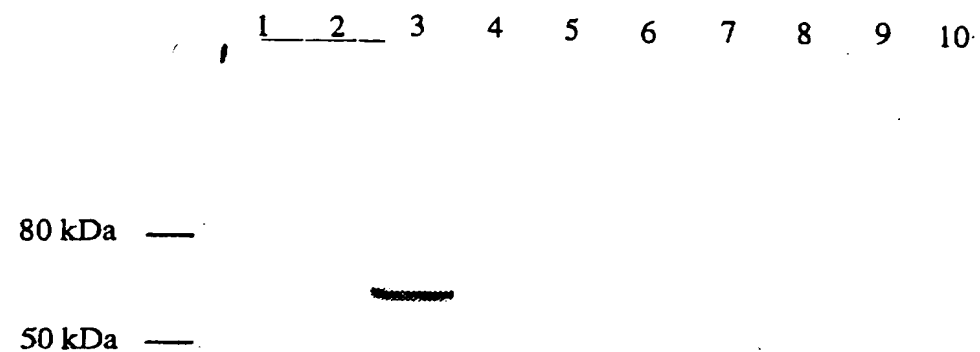
Figur 4a)

5/28



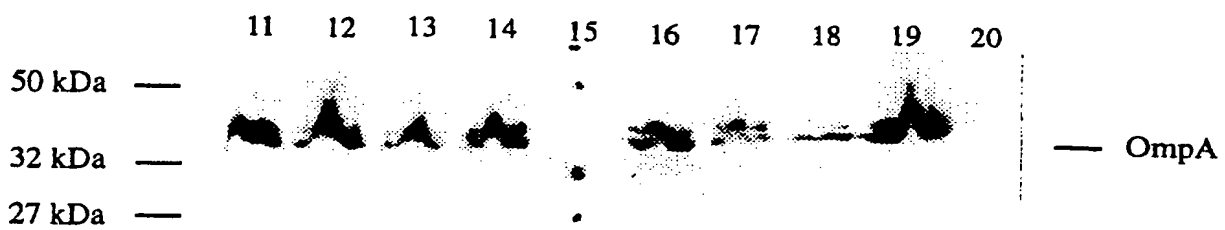
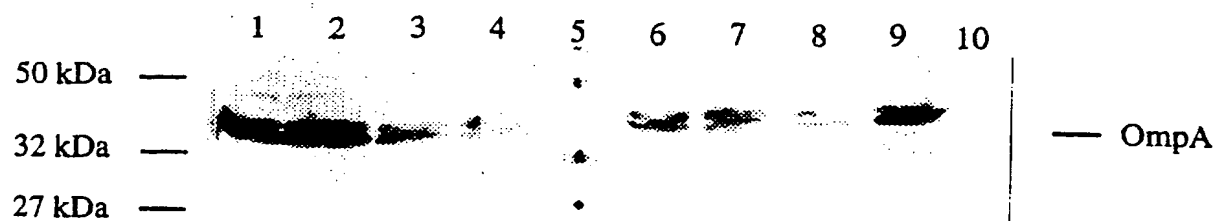
Figur 4b)

6/20



Figur 4c)

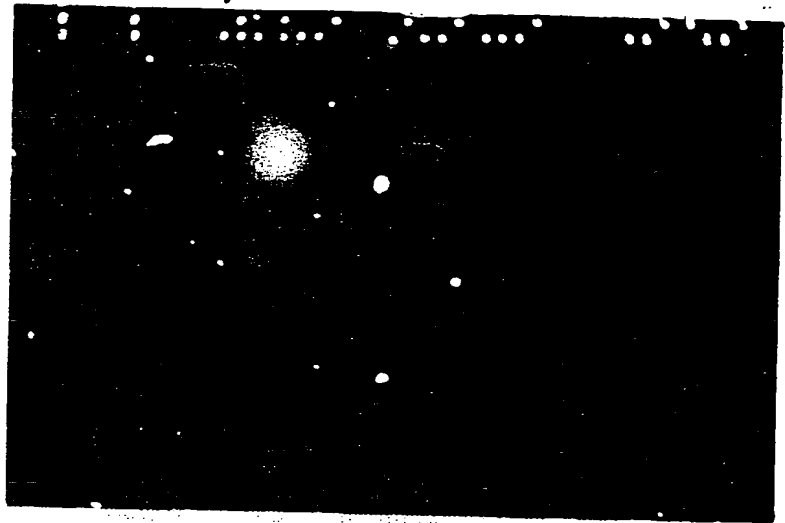
7/28



8/28

Figur 5

a) *E.coli* UT5600 pBA



b) *E.coli* UT5600 pTK1



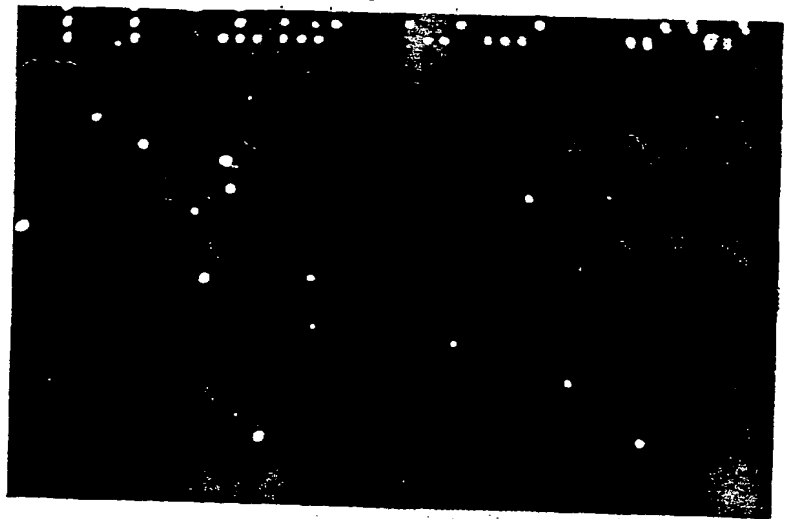
c) *E.coli* UT5600 pJM7



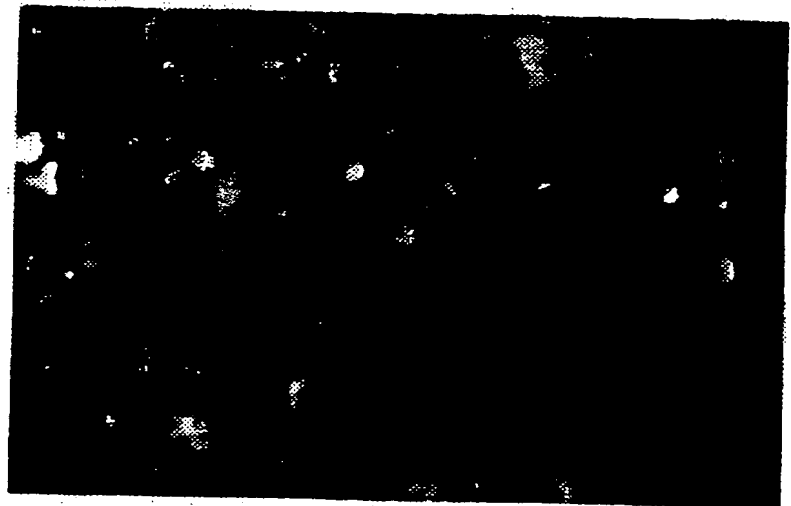
ERSATZBLATT (REGEL 26)

Figur 5

d) *E.coli* UT5600 pJM22



e) *E.coli* UT5600 pTK61



Figur 6

DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 10/28

Name	Verwendung 1)	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
EF16	PCR (+)	36	TGTAACGACGGCCAGTATCACGAGG CCCTTTCGT
JM1	PCR (-)	27	GGAAGATCTGCCTCAGAAATGAGGGCC
JM6	PCR (-)	30	CATGGTACCAGGCGTTTTATTATCCCT AC
JM7	PCR (+)	30	CGGGGTACCCTTAATCCTACAAAAGAA AGT
JM20	PCR (+)	44	AAGGGTACCTTTGAAATACTCCGGAGTA ATATTTTGGAGGTGTTT

1)

(+) und (-) beziehen sich auf den kodierenden (+) bzw. den dazu komplementären DNA-Strang (-).

Figur 7

11/28

GCATCCGTGTGGATGAAGATCACTGGAGGAATAAGCTCTGGTAAGCTTAATGACGGGCAA
1 A S V W M K I T G G I S S G K L N D G Q 60
AATAAAACAACAACCAATCAGTTTATCAATCAGCTCGGGGGGATATTTATAAATTCCAT
61 N K T T T N Q F I N Q L G G D I Y K F H 120
GCTGAACAACCTGGGTGATTTTACCTTAGGGATTATGGGAGGATACGCGAATGCAAAAGGT
121 A E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K G 180
AAAACGATAAATTACACGAGCAACAAAGCTGCCAGAAACACACTGGATGGTTATTCTGTC
181 K T I N Y T S N K A A R N T L D G Y S V 240
GGGGTATACGGTACGTGGTATCAGAATGGGGAAAATGCAACAGGGCTCTTTGCTGAAACT
241 G V Y G T W Y Q N G E N A T G L F A E T 300
TGGATGCAATATAACTGGTTTAATGCATCAGTGAAAGGTGACGGACTGGAAGAAGAAAAA
301 W M Q Y N W F N A S V K G D G L E E E K 360
TATAATCTGAATGGTTTAACCGCTTCTGCAGGTGGGGGATATAACCTGAATGTGCACACA
361 Y N L N G L T A S A G G G Y N L N V H T 420
TGGACATCACCTGAAGGAATAACAGGTGAATTCTGGTTACAGCCTCATTTGCAGGCTGTC
421 W T S P E G I T G E F W L Q P H L Q A V 480
TGGATGGGGGTTACACCGGATACACATCAGGAGGATAACGGAACGGTGGTGCAGGGAGCA
481 W M G V T P D T H Q E D N G T V V Q G A 540
GGGAAAAATAATATTCAGACAAAAGCAGGTATTCTGTCATCCTGGAAGGTGAAAAGCACC
541 G K N N I Q T K A G I R A S W K V K S T 600
CTGGATAAGGATACCGGGCGGAGGTTCCGTCCTATATAGAGGCAAACCTGGATCCATAAC
601 L D K D T G R R F R P Y I E A N W I H N 660
ACTCATGAATTTGGTGTTAAAAATGAGTGATGACAGCCAGTTGTTGTCAGGTAGCCGAAAT
661 T H E F G V K M S D D S Q L L S G S R N 720
CAGGGAGAGATAAAGACAGGTATTGAAGGGGTGATTACTCAAACCTTGTCAGTGAATGGC
721 Q G E I K T G I E G V I T Q N L S V N G 780
GGAGTCGCATATCAGGCAGGAGGTACGGGAGCAATGCCATCTCCGGAGCACTGGGGATA
781 G V A Y Q A G G H G S N A I S G A L G I 840
AAATACAGCTTC
841 K Y S F 852

Figur 8

12/20

CTGCGCCTGCGCGCCGACGCCGCGGGCCATGGGCGCGTACGTTTCAGCGAGCGCCAGCAG
1 L R L R A D A G G P W A R T F S E R Q Q 60
ATCAGCAACCGCCACGCCGCGCCTACGACCAGACGGTCAGCGGGCTGGAGATCGGCCTG
61 I S N R H A R A Y D Q T V S G L E I G L 120
GACCGTGGCTGGAGCGCGTCGGGCGGGCGCTGGTACGCCGCGGCCTGCTCGGCTACACC
121 D R G W S A S G G R W Y A G G L L G Y T 180
TATGCCGACCGCACCTATCCCGGCGACGGTGGCGGCAAGGTCAAGGGCCTGCACGTCGGC
181 Y A D R T Y P G D G G G K V K G L H V G 240
GGCTACGCCCGCCTATGTGGCGGATGGCGGCTACTATCTCGACACCGTGTCTGGGCTGGGC
241 G Y A A Y V G D G G Y Y L D T V L R L G 300
CGCTACGATCAGCAATACAACATTGCCGGCACCGATGGCGGCCGCGTCAACGCCGACTAC
301 R Y D Q Q Y N I A G T D G G R V T A D Y 360
CGCACAAAGCGCGCCGCGATGGTCTCGAAGGCGGGCGCGGTTTCGAGCTGCCCAACGAC
361 R T S G A A W S L E G G R R F E L P N D 420
TGGTTCGCCGAACCGCAGGCCGAGGTCTATGCTGTGGCGCACGTCAGGCAAGCGCTATCGC
421 W F A E P Q A E V M L W R T S G K R Y R 480
GCCAGCAATGGCCTGCGCGTCAAGGTGGACGCCAACACCGCCACGCTGGGCCGCGCTGGGC
481 A S N G L R V K V D A N T A T L G R L G 540
TTGCGCTTCGGCCGCGCATCGCCCTGGCCGGCGGCAACATCGTGCAGCCCTACGCCAGG
541 L R F G R R I A L A G G N I V Q P Y A R 600
CTCGGCTGGACGCAGGAGTTCAAAGCACGGGCGATGTGCGCACCAATGGCATTGGCCAT
601 L G W T Q E F K S T G D V R T N G I G H 660
GCCGGCGCAGGCCGCCACGGCCGCGTGGAACTGGGCGCGGGCGTTCGACGCCGCGTTGGGC
661 A G A G R H G R V E L G A G V D A A L G 720
AAGGGGCACAACCTCTATGCTTCGTACGAGTACGCGGCGGGCGACCGGATCAACATTCCG
721 K G H N L Y A S Y E Y A A G D R I N I P 780
TGGTCTGTTCCACGCCGCGTACCGCTACAGCTTC
781 W S F H A G Y R Y S F 813

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Figur 9

13/28

```

1  CAAAGCCTGTTGCGATTAGAAGCCGCACTTGAGGTTATTGATGCCCCACAGCAATCGGAA
   Q S L F A L E A A L E V I D A P Q Q S E 60
61  AAAGATCGTCTAGCTCAAGAAGAAGCGGAAAAACAACGCAAAACAAAAGACTTGATCAGC
   K D R L A Q E E A E K Q R K Q K D L I S 120
121 CGTTATTCAAATAGTGCGTTATCAGAATTATCTGCAACAGTAAATAGTATGCTTTCTGTT
   R Y S N S A L S E L S A T V N S M L S V 180
181 CAAGATGAATTAGATCGTCTTTTTGTAGATCAAGCACAACTCTGCCGTGTGGACAAATATC
   Q D E L D R L F V D Q A Q S A V W T N I 240
241 GCACAGGATAAAAGACGCTATGATTCTGATGCGTTCCGTGCTTATCAGCAGCAGAAAACG
   A Q D K R R Y D S D A F R A Y Q Q Q K T 300
301 AACTTACGTCAAATTGGGGTGCAAAAAGCCTTAGCTAATGGACGAATTGGGGCAGTTTTC
   N L R Q I G V Q K A L A N G R I G A V F 360
361 TCGCATAGCCGTTTCAGATAATACCTTTGATGAACAGGTTAAAAATCACGCGACATTAACG
   S H S R S D N T F D E Q V K N H A T L T 420
421 ATGATGTCGGGTTTTGCCCAATATCAATGGGGCGATTTACAATTGGTGTAACGTGGGA
   M M S G F A Q Y Q W G D L Q F G V N V G 480
481 ACGGGAATCAGTGCGAGTAAATGGCTGAAGAACAAAGCCGAAAAATTCATCGAAAAGCG
   T G I S A S K M A E E Q S R K I H R K A 540
541 ATAAATTATGGCGTGAATGCAAGTTATCAGTTCCGTTTAGGGCAATTGGGCATTACAGCCT
   I N Y G V N A S Y Q F R L G Q L G I Q P 600
601 TATTTTGGAGTTAATCGCTATTTTATTGAACGTGAAAATTATCAATCTGAGGAAGTGAGA
   Y F G V N R Y F I E R E N Y Q S E E V R 660
661 GTGAAAACGCCTAGCCTTGCAATTAATCGCTATAATGCTGGCATTTCGAGTTGATTATACA
   V K T P S L A F N R Y N A G I R V D Y T 720
721 TTTACTCCGACAGATAATATCAGCGTTAAGCCTTATTTCTTCGTCAATTATGTTGATGTT
   F T P T D N I S V K P Y F F V N Y V D V 780
781 TCAAACGCTAACGTACAAACCACGGTAAATCTCACGGTGTTGCAACAACCATTTGGACGT
   S N A N V Q T T V N L T V L Q Q P F G R 840
841 TATTGGCAAAAAGAAGTGGGATTAAAGGCAGAAATTTTACATTTCCAAATTTCCGCTTTT
   Y W Q K E V G L K A E I L H F Q I S A F 900
901 ATCTCAAAATCTCAAGGTTCACTCAACTCGGCAAAACAGCAAAATGTGGGCGTGAAATTGGGC
   I S K S Q G S Q L G K Q Q N V G V K L G 960
961 TATCGTTGG
   Y R W 969

```

Figur 10

14/28

ACCTCAATCTACACCACAGTACAGGCAGGATGGGATCATGTATTTGGCAGCGAGGGTGGGA
1 T S I Y T T V Q A G W D H V F G S E G G 60
AATGACTTTTGTAGGTTTGGCTGTGGCTTATGCAGGTGCAGCGATGAGCTCTGAGAAGAAA
61 N D F L G F A V A Y A G A A M S S E K K 120
GAACAGCTAGTAAATGGTGCACAAAAGGGAGTAAAATCCAGCGGTGGAAATGCCTTTGAA
121 E Q L V N G A Q K G V K S S G G N A F E 180
ATCTCGCTCTACAACCTCTATGTACAAGATGGTGTGCTTCTAGCACAGATTTCAAGTAT
181 I S L Y N S Y V Q D G A A S S T D F K Y 240
GGTTTTTATAGTGATAGCGTGGCAAAATTCAGCTTCTTGTGGAACAAGCTTACAATGTTT
241 G F Y S D S V A K F S F L W N K L T M F 300
GGTGAGGACAGCTCTCCTAACATGCAAAACTTTGGTTTACCTTCTCTCAAGAGATTGGT
301 G E D S S P N M Q N F G F T F S Q E I G 360
TATCGCTTCTTGTAGGAAATCACAACGAGTGGTATATCACTCCACAAGGGCAAGTTGCT
361 Y R F L L G N H N E W Y I T P Q G Q V A 420
TTAGGTTATTTCAACCAAAGCAATATCAAGCAAACCTAGGAAGCCACTGGCTAAAAGGC
421 L G Y F N Q S N I K Q T L G S H W L K G 480
GAGCAAAGTTCTATCTTACAGTGCAGGGCGAATTGGAAGCAACTTTGGTTATAGATT
481 E Q S S I F T V Q G R I G S N F G Y R F 540
AATCAATTCAGTGAAGACAAGGGCTGGGCTTCAGAGCTTTATTTGGGCTTGTGGTACATC
541 N Q F T E D K G W A S E L Y L G L W Y I 600
GGCGATTATATCAGTGGTGGCAATCTTACCCTCGTGTCTGACCTAGGTTCTGTAAACACT
601 G D Y I S G G N L T L V S D L G S V N T 660
TTAAGGACTTTGAGCTCTACTGGTAGATTTCCTTTAACATTGGTACAAACTTCGTCGTC
661 L R T L S S T G R F A F N I G T N F V V 720
AAAGATAATCATAGATTCTACTTTGATTTTGAAAGAAGCTTTGGAGGCAAAATCATCACA
721 K D N H R F Y F D F E R S F G G K I I T 780
GATTACCAATTCAACATTGGCTATCGCTATAACTTTGGCGAAAACAGAAAATACGTTTCT
781 D Y Q F N I G Y R Y N F G E N R K Y V S 840
CTTCTTGCAGGTAGTATGAAAGACACTATCAAAAAAGATGATAAGAAAGAAAACAAAGAA
841 L L A G S M K D T I K K D D K K E N K E 900
GAGACAGAAGAAATTGAG
901 E T E E I E 918

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Figur 11

1 GAAACCAACCATGTGGATTTCGTACTGTTGGTGGACATAATGAGCATAATTTAGCTGATAGA 60
E T T M W I R T V G G H N E H N L A D R -

61 CAATTAAAAACCAACAGCTAACAGGATGCTTTATCAGATTGGTGGAGATATTTTGAAGACA 120
Q L K T T A N R M V Y Q I G G D I L K T -

121 AACTTCACTGATCATGATGGCTTGCATGTGGGTATTATGGGAGCTTATGGATATCAGGAT 180
N F T D H D G L H V G I M G A Y G Y Q D -

181 AGCAAAACTCATAATAAGTATACTAGTTATAGTTTACGAGGAACCTGTGAGCGGTTATACT 240
S K T H N K Y T S Y S S R G T V S G Y T -

241 GCCGGTTTGTACAGTTCTTGGTTTCAGGATGAAAAAGAACGAACAGGTCTATATATGGAT 300
A G L Y S S W F Q D E K E R T G L Y M D -

301 GCTTGGTTGCAGTACAGTTGGTTTAATAATACAGTCAAAGGAGATGGGTTAACTGGTGAG 360
A W L Q Y S W F N N T V K G D G L T G E -

361 AAATATTCCAGCAAAGGAATAACAGGAGCTTTGGAAGCTGGCTATATCTACCCAACCATA 420
K Y S S K G I T G A L E A G Y I Y P T I -

421 CGCTGGACTGCTCATAATAATATTGACAACGCATTGTATCTCAATCCACAAGTCCAGATA 480
R W T A H N N I D N A L Y L N P Q V Q I -

481 ACTAGGCATGGGGTAAAGCAAACGACTATATTGAACACAATGGCACTATGGTCACATCC 540
T R H G V K A N D Y I E H N G T M V T S -

541 TCTGGGGGCAATAATATTCAAGCAAATTTGGGATTGCGTACATCCTTAATTAGTCAGAGT 600
S G G N N I Q A K L G L R T S L I S Q S -

601 TGTATCGATAAGGAGACTCTTCGTAAGTTTGAACCATTTTGGGAAGTGAATTGGAATGG 660
C I D K E T L R K F E P F L E V N W K W -

661 AGCTCAAAGCAATATGGTGTAAATTATGAATGGCATGTCAAATCACCAGATAGGCAACCGT 720
S S K Q Y G V I M N G M S N H Q I G N R -

721 AATGTGATTGAACTCAAACTGGTGTGGGGGGCGTCTTGCAGATAACCTAAGCATCTGG 780
N V I E L K T G V G G R L A D N L S I W -

781 GGAAACGTATCTCAGCAATTGGGTAAACAGTTACAGAGACACCCAAGGTATTTTGGGT 840
G N V S Q Q L G N N S Y R D T Q G I L G -

841 GTGAAATATACCTTC 855
V K Y T F -

16/28

CTGGGCGAGTTGGCGCTGTAATCCGGACGCCGGCGCGCTTGGGGCCGCGCTTCGCGCAA
1 L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q 60
CGCCAGCAGCTGGACAACCGCGCGCGGGCGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGCGCTTCGAG
61 R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E 120
CTGGGCGCGCGACCCACGCGGTGGCGGTGGCCGCGCGGACGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
121 L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A 180
GGCTATACGCGCGCGACCGCGGCTTCACCGCGACGGCGGGCGGCCACACCGACAGCGTG
181 G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V 240
CATGTCGGGGGCTATGCCACATATATCGCCGACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTG
241 H V G G Y A T Y I A D S G F Y L D A T L 300
CGCGCCAGCCGCGCTGGAGAATGACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGACGGGTACGCGGTCAAG
301 R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K 360
GGCAAGTACCGCACCCATCGGGTGGGCGCGCTCGCTCGAGGCGGGCGCGCTTTACCCAT
361 G K Y R T H G V G A S L E A G R R F T H 420
GCCGACGGCTGGTTCTCTCGAGCCGCGAGGCCGAGCTGGCGGTATTCCGGGCCGCGCGCGGT
421 A D G W F L E P Q A E L A V F R A G G G 480
CGGTACCGCGCGGCCAACGGCGCTGCGGGTGC GCGACGAAGGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
481 A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G 540
CGCCTGGGCCTGGAGGTGGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGCAGGTGCAGCCA
541 R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P 600
TACATCAAGGCCAGCGTGCTGCAGGAGTTTCGACGGCGCGGGTACGGTACACACCAACGGC
601 Y I K A S V L Q E F D G A G T V H T N G 660
ATCGCGCACCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCGAACTGGGCCTGGGCATGGCCGCC
661 I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A 720
GCGCTGGGCGCGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCGAAGCTG
721 A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L 780
GCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
781 A M P W T F H A G Y R Y S W 822

Figur 13

17/28

CTGGGCGAGTTGCGCCTGAATCCGGACGCCGCGCGCTTGGGGCCGCGGCTTCGCGCAA
1 L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q 60
CGCCAGCAACTGGACAACCGCGCGCGCGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCCGCTTCGAG
61 R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E 120
CTGGGCGCGCGACACGCGGTGGCGSTGGCCGCGCGCGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
121 L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A 180
GGCTATACGCGCGCGACCGCGCTTTACGCGGACGGCGCGCGCCACACCGACAGCGTG
181 G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V 240
CATGTCGGGGGCTATGCCACCTATATCGCCAACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTG
241 H V G G Y A T Y I A N S G F Y L D A T L 300
CGCGCCAGCCGCTCGAAAATGACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGATGGGTACGCGGTCAAG
301 R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K 360
GGCAAGTACCGCACCCATGGGGTAGGCGTCTCGCTCGAGGCGGGCCGCGCTTCGCCCAT
361 G K Y R T H G V G V S L E A G R R F A H 420
GCCGACGGCTGGTTCTCGAGCCGACAGCCGAGCTGGCGGTGTTCCGGGTGGCGGGCGGT
421 A D G W F L E P Q A E L A V F R V G G G 480
GCGTACCGCGCGGCCAATGGCCTGCGGGTGGCGGACGAAGGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
481 A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G 540
CGCCTGGGCCTGGAGGTGCGCAAGCGCATGCAACTGGCAGGCGGCAGGCAGGTGCAGCCA
541 R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P 600
TACATCAAGGCCAGCGTGTGTCAGGAGTTCGACGGCGCGGTACGGTACGCACCAACGGC
601 Y I K A S V L Q E F D G A G T V R T N G 660
ATCGCGCATCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCGAACTGGGCCTGGGCATGGCCGCC
661 I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A 720
GCGCTGGGCGCGGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCCGAAGCTG
721 A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L 780
GCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
781 A M P W T F H A G Y R Y S W 822

Figur 14

18/28

1 AAGTTTGGTGCGTGGATAAGCCCGTTTGTCCGGTAATGCAACGCAGAAGATGTGTAACAGT
K F G A W I S P F V G N A T Q K M C N S 60
61 ATAAGTGGTTATAAGTCTGATACAACTGGTGGCACTATAGGTTTGGACGGCTTCGTTAGC
I S G Y K S D T T G G T I G F D G F V S 120
121 GATGATCTAGCACTCGGACTTGCATATACAAGAGCCGATACTGACATTAAGCTAAAAAAT
D D L A L G L A Y T R A D T D I K L K N 180
181 AATAAAACGGGCGATAAGAATAAGGTAGAGAGCAACATCTATTCTTTATACGGTTTATAT
N K T G D K N K V E S N I Y S L Y G L Y 240
241 AATGTACCTTATGAAAATCTCTTCGTTGAAGCTATAGCATCTTACTCAGATAATAAGATA
N V P Y E N L F V E A I A S Y S D N K I 300
301 AGAAGCAAATCAAGACGTGTTATTGCAACGCACTAGAGACTGTCGGTTATCAAACCTGCA
R S K S R R V I A T T L E T V G Y Q T A 360
361 AACGGTAAGTATAAATCCGAAAGCTATACAGGTCAGTTAATGGCTGGTTATACCTATATG
N G K Y K S E S Y T G Q L M A G Y T Y M 420
421 ATGCCTGAGAACATTAACTTAACACCGCTAGCTGGGCTTAGATATTGCACTATCAAAGAT
M P E N I N L T P L A G L R Y S T I K D 480
481 AAGGGCTATAAGGAAACCGGTACTACTTACCAAAATCTTACCGTTAAAGGCAAGAACTAT
K G Y K E T G T T Y Q N L T V K G K N Y 540
541 AATACTTTTCGACGGTTTACTCGGTGCTAAAGTATCAAGTAATATCAATGTCAATGAAATA
N T F D G L L G A K V S S N I N V N E I 600
601 GTGCTAACACCTGAGCTTTACGCAATGGTCGATTATGCATTCAAGAATAAAGTTTCGGCG
V L T P E L Y A M V D Y A F K N K V S A 660
661 ATTGATGCAAGGTTACAAGGTATGACTGCTCCTCTTCCAACCAACAGCTTTAAGCAAAGC
I D A R L Q G M T A P L P T N S F K Q S 720
721 AAAACAAGTTTTGATGTCCGTGTCGGTGTACTGCTAAGCATAAAATGATGGAATACAGG
K T S F D V G V G V T A K H K M M E Y R 780
781 ATTAACTACGATACCAATATCGGAAGTAAGTATTTTCGCTCAGCAAGGTAGTGTAAGTT
I N Y D T N I G S K Y F A Q Q G S V K V 840
CGTGTTAATTTT
841 R V N F 852

Figur 15

19/28

TCTTATGGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATTGCAGAACAAGACAAAAAAGGTGGT
1 S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G 50
-
ATAGCTGGTTATAAAGCAAAACTACTGGGGTTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAGC
61 I A G Y K A K T T G V V V G L D T L A S 120
-
GATAACCTAATGATTGGGGCAGCTATTGGGATCACTAAACTGATATAAAACACCAAGAT
121 D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D 180
-
TATAAGAAAGGTGATAAACTGATATTAATGGTTTATCATTCTCTCTATATGGTTCCCAA
181 Y K K G D K T D I N G L S F S L Y G S Q 240
-
CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAATTCAATCTTTACCTTAAACAAAGTCAAA
241 Q L V K N F F A Q G N S I F T L N K V K 300
-
AGTAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGAGTCTAATGGTAAGATGAGCAAGCAAATTGCTGCT
301 S K S Q R Y F F E S N G K M S K Q I A A 360
-
GGTAATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAATTTAATATTTGGTTATGATTATAATGCA
361 G N Y D N M T F G G N L I F G Y D Y N A 420
-
ATGCCAAATGTATTAGTAACCTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAAATCTTCTAATGAA
421 M P N V L V T P M A G L S Y L K S S N E 480
-
AATTATAAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAAATAAGCGCATTAAATAGCAAATTTAGTGAT
481 N Y K E T G T T V A N K R I N S K F S D 540
-
AGAGTCGATTTAATAGTAGGGGCTAAAGTAGCTGGTAGTACTGTGAATATAACTGATATT
541 R V D L I V G A K V A G S T V N I T D I 600
-
GTGATATATCCGGAAATTCATTCTTTGTGGTGACAAAGTAAATGGTAAATTATCTAAC
601 V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S N 660
-
TCTCAGTCTATGTTAGATGGACAAACTGCTCCATTTATCAGTCAACCTGATAGAACTGCT
661 S Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A 720
-
AAAACGTCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAACATAAAATCTGATGCTAAGATGGAGTAT
721 K T S Y N I G L S A N I K S D A K M E Y 780
-
GGTATCGGTTATGATTTTAATTCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA
781 G I G Y D F N S A S K Y T A H Q G T L K 840
-
GTACGTGTAAACTTC
841 V R V N F 855
-

Figur 16

20/28

GCTTACGGTATATGGGCAAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGT
1 A Y G I W A K P F Y T D A H Q S K K G G 60
TTAGCTGGTTATAAAGCTAAAACCCACCGGTGCTGAATCGGTTTATGATACGCTAGCTAAC
61 L A G Y K A K T T G V V I G L D T L A N 120
GATAATTTAATGATCGGTGCTGCTATCGGTATCACTAAAACCTGATATAAAACATCAAGAT
121 D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D 180
TATAAGAAAGGTGATAAAACCGACGTTAACGGTTTCTCATTCTCTCTATATGGTGCCCAG
181 Y K K G D K T D V N G F S F S L Y G A Q 240
CAGCTTGTTAAGAAGCTTCTTTGCTCAAGGTAGTGCAATATTTAGCTTAAACCAAGTGAAG
241 Q L V K N F F A Q G S A I F S L N Q V K 300
AACAAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAACGGTAATATGAGCAAGCAAATTGCTGCC
301 N K S Q R Y F F D A N G N M S K Q I A A 360
GGTCATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAACTTAACAGTCGGTTATGATTACAATGCA
361 G H Y D N M T F G G N L T V G Y D Y N A 420
ATGCAAGGTGTGTTAGTAACTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAAGTCTTCTGACGAA
421 M Q G V L V T P M A G L S Y L K S S D E 480
AACTACAAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAACAAGCAAGTTAACAGCAAATTTAGCGAT
481 N Y K E T G T T V A N K Q V N S K F S D 540
AGAACCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAGCCGGCAGTACTATGAACATAACTGATCTT
541 R T D L I V G A K V A G S T M N I T D L 600
GCGGTATATCCAGAAGTTCACGCTTTTGTGGTTTACAAAAGTAACCGGTAGATTATCTAAA
601 A V Y P E V H A F V V H K V T G R L S K 660
ACTCAGTCTGTATTAGACGGACAAGTTACTCCGTGTATCAACCAGCCTGACAGAACCACT
661 T Q S V L D G Q V T P C I N Q P D R T T 720
AAAACATCTTATAATTTAGGTTTAAAGTGCAAGCATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAC
721 K T S Y N L G L S A S I R S D A K M E Y 780
GGAATCGGTTACGATGCTCAGATTTCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTCTAAA
781 G I G Y D A Q I S S K Y T A H Q G T L K 840
GTCCGTGTAAACTTC
841 V R V N F 855

Figur 17

21/28

1 TCTTATGGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATCGCAGAACAAGATAAAAAAGGTGGT 60
S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G -
61 CTAGCTGGTTATAAAGCAAAACTGCTGGTGTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAAT 120
L A G Y K A K T A G V V V G L D T L A N -
121 GATAACCTAATGATTGGTGCAGCTATTGGTATCACTAAAACTGACATAAAACACCAAGAT 180
D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D -
181 TATAAAAAAGGTGATAAACTGATATTAAGGGTTTATCCTTCTCTATATGGTGGCCAG 240
Y K K G D K T D I K G L S F S L Y G A Q -
241 CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAGTGAATATTTACCTTAAACAAAGTCAAA 300
Q L V K N F F A Q G S A I F T L N K V K -
301 AGTAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAATGGTAAGATGAACAAGCAAATTGCTGCC 360
S K S Q R Y F F D A N G K M N K Q I A A -
361 GGTAATTATGATAACATAACATTCGGTGGTAATTTAATGTTTGGTTATGATTATAATGCA 420
G N Y D N I T F G G N L M F G Y D Y N A -
421 CTGCAAGGTGTATTAGTGACTCCAATGGCAGGGCTTAGCTACTTAAAATCTTCTAATGAA 480
L Q G V L V T P M A G L S Y L K S S N E -
481 AACTATAAAGAACTGGTACTACAGTTGCAAATAAGCGCATTACAGCAAATTTAGTGAT 540
N Y K E T G T T V A N K R I H S K F S D -
541 AGAATCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAACTGGTAGTGCTATGAATATAAATGATATT 600
R I D L I V G A K V T G S A M N I N D I -
601 GTGATATATCCAGAAATTCATTCTTTGTAGTGACACAAAGTAAATGGTAAGCTATCTAAG 660
V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S K -
661 GCTCAGTCTATGTTAGATGGACAACTGCTCCATTTATCAGTCAGCCTGATAGAAGTCT 720
A Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A -
721 AAAACATCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAATATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAT 780
K T S Y N I G L S A N I R S D A K M E Y -
781 GGTATCGGTTATGATTTAATGCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA 840
G I G Y D F N A A S K Y T A H Q G T L K -
841 GTACGTATAAATTTTC 855
V R I N F -

Figur 18

22/28

1 CAGGGGGATGCCGGTGTCTGGGCACGCATAATGAATGGTACCGGTTCCGGCAGATGGTGAC 60
Q G D A G V W A R I M N G T G S A D G D -
61 TACAGCGATAACTACACTCACGTTTCAGATTGGTGTGACAGAAAGCATGAGCTGGACGGT 120
Y S D D N Y T H V Q I G V D R K H E L D G -
121 GTGGATTTTATTTACGGGGGCATTGCTGACCTATACGGACAGCAATGCAAGCAGCCACGCA 180
V D L F T G A L L T Y T D S N A S S H A -
181 TTCAGTGGAAAAACAAATCCGTGGGTGGCGGTCTGTATGCCTCTGCACTCTTTAATTCC 240
F S G K N K S V G G G L Y A S A L F N S -
241 GGAGCTTATTTTGACCTGATTGGTAAATATCTCCATCATGATAATCAGCACACGGCGAAT 300
G A Y F D L I G K Y L H H D N Q H T A N -
301 TTTGCCCTCACTGGGAACAAAAGACTACAGCTCTCATTCCCTGGTATGCCGGTGTGAAAGTT 360
F A S L G T K D Y S S H S W Y A G A E V -
361 GGTATTCCTTACCACCTGACGAAAGAGTCCTGGGTGGAGCCACAGATAGAGCTGGTTTAC 420
G Y R Y H L T K E S W V E P Q I E L V Y -
421 GGTTCTGTATCAGGAAAAGCTTTTAGCTGGGAAGCCCCGGGAATGGCTCTGAGCATGAAA 480
G S V S G K A F S W E A R G M A L S M K -
481 GACAAGGATTATAACCCACTGATTGGCCGTACTGGTGTGACGTGGGAAGAGCCTTCTCC 540
D K D Y N P L I G R T G V D V G R A F S -
541 GGAGACGACTGGAAAATCACAGCTCGAGCCGGGCTGGGTATCAGTTTCGACCTGCTGGCG 600
G D D W K I T A R A G L G Y Q F D L L A -
601 AACGGAGAAACGGTTCTGCAGGATGCTTCCGGAGAGAAACGTTTCGAAGGTGAAAAAGAT 660
N G E T V L Q D A S G E K R F E G E K D -
661 AGCAGGATGCTGATGACGGTAGGGATGAATGCCGAAATTAAGGATAATATGCGTTTGGGA 720
S R M L M T V G M N A E I K D N M R L G -
721 CTGGAGCTGGAGAAATCAGCGTTCCGGGAAATATAATGTGGATAATGCGATAAACGCCAAC 780
L E L E K S A F G K Y N V D N A I N A N -
781 TTCCGTTATGTTTTTC 795
F R Y V F -

ERSATZBLATT (REGEL 26)

23/28

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Figur 20

24/20

ACCCGTCAACTGTCCGGCCAGATCCACGCGGATATGGCTTCCGCCCAGATCAACGAAAGC
1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
T R Q L S G Q I H A D M A S A Q I N E S -

CGTTACCTGCGCGATACCGCCACCGAGCGCTTGC GCCAGGCGGAAGGCCGCGCACCCT
61-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R Y L R D T A T E R L R Q A E G R R T A -

ACCGACATTAAAGCGGATGACAACGGCGCCTGGGCGAAACTGCTGGGTAGCTGGGGGCAT
121-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
T D I K A D D N G A W A K L L G S W G H -

GCTTCCGGCAACGACAACGCCACCGGTTACCAGACCTCCACCTATGGCGTGCTGTTAGGT
181-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
A S G N D N A T G Y Q T S T Y G V L L G -

CTGGACAGCGAACTGTTTGGCGACGGCCGGCTTGGCATGATGACCGGGTATACCCGCACT
241-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
L D S E L F G D G R L G M M T G Y T R T -

TCGCTGGATGGAGGTTATCAGTCAGATGCTCACAGCGACAACCTACCATCTGGGGCTGTAC
301-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
S L D G G Y Q S D A H S D N Y H L G L Y -

GGCGACAAACGCTTCGGCGCGTTGGCGCTGCGAGCGGGCGGCACCTATACCTGGCATCGC
361-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G D K R F G A L A L R A G G T Y T W H R -

ATCGACACCTCGCGTTCGGTGAACCTACGGCGCGCAGTCGGATCGCGAGAAGGCCAAGTAT
421-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
I D T S R S V N Y G A Q S D R E K A K Y -

AACGCGCGCACCGGTCAGCTGTTTCATCGAAAGCGGCTACGATTGGACGAGCGATGCGGTC
481-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
N A R T G Q L F I E S G Y D W T S D A V -

AACCTTGAGCCGTTCCGCAACCTGGCGTATACCCATTACCGTAACGAGGAGATCAACGAG
541-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
N L E P F A N L A Y T H Y R N E E I N E -

CAAGGCGGGGCGAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAACAAAGTCAGTCCGCCACCGCCTCGACG
601-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
Q G G A A A L R G D K Q S Q S A T A S T -

TTGGGTCTGCGCGCCGACACCGAGTGGCAAACCGACAGCGTGGCGATCGCGCTGCGCGGC
661-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
L G L R A D T E W Q T D S V A I A L R G -

GAGCTGGGTTGGCAGCATCAGTACGGCAAGCTGGAGCGTAAAACGCAGCTGATGTTCAAA
721-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
E L G W Q H Q Y G K L E R K T Q L M F K -

CGCACTGATGCGGCGTTCGACGTGAACAGCGTGCCCTGTTTCTCGCGATGGCGCGATTCTG
781-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
R T D A A F D V N S V P V S R D G A I L -

AAAGCGGGCGTCGATGTATCGATTAAACAAAACGCCGTCCTGTCCCTTGGCTACGGCGGG
841-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
K A G V D V S I N K N A V L S L G Y G G -

CAGCTGTGCTCCAACCACCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGTCTGACCTGGCGCTTC
901-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 957
Q L S S N H Q D N S V N A G L T W R F -

25/28

ERSATZBLATT (REGEL 26)

26/28

1 TTCCGTCAGCTGTCGGGGCAAATCCATGCGGACATCGCGTCGGCGCTGGTGAACGACAGC 60
F R Q L S G Q I H A D I A S A L V N D S -

61 CGCTACCTGCGTGAGGCGCTGAACGGGCGTCTGCGTCAGGCGGAAGGGCTGGCGAGCTCG 120
R Y L R E A L N G R L R Q A E G L A S S -

121 TCGGCCATCAAGGCGGACGAGGACGGCGCCTGGGCGCAGCTGCTGGGAGCGTGGGACCAT 180
S A I K A D E D G A W A Q L L G A W D H -

181 GCGTCGGGCGACGCCAACGCCACCGGCTATCAGGCCTCGACCTACGGGGTGTCTGGTGGGG 240
A S G D A N A T G Y Q A S T Y G V L V G -

241 CTGGACTCGGGCGGCGGCGCCGACTGGCGGCTGGGGGTGGCGACCGGCTACACCCGCACC 300
L D S A A A A D W R L G V A T G Y T R T -

301 TCGCTGCACGGCGGGTATGGGTGCAAGGCGGACAGCGACAACCTACCACCTGGCGGCGTAC 360
S L H G G Y G S K A D S D N Y H L A A Y -

361 GGCGACAAGCAGTTCGGGGCGCTGGCGCTGCGGGCGGGGCGGGCTACACCTGGCACCGC 420
G D K Q F G A L A L R G G A G Y T W H R -

421 ATCGACACCAAGCGGTGCGTGAACCTACGGGATGCACTCGGACCGCGACACGGCGAAGTAC 480
I D T K R S V N Y G M Q S D R D T A K Y -

481 AGCGCGCGCACCGAGCAGCTGTTGCGGAAGCGGGCTACAGCGTGAAGGGCGAGTGGCTG 540
S A R T E Q L F A E A G Y S V K G E W L -

541 AACCTGGAGCCGTTGCTCAACCTGGCGTACGTGAACCTTGAAAACAACGGCATCGCGGAA 600
N L E P F V N L A Y V N F E N N G I A E -

601 AGCGGCGGCGCAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAGCAGCACACCGACCGGACGGTGTGACG 660
S G G A A A L R G D K Q H T D A T V S T -

661 CTGGGACTGCGCGCGGACACTGAGTGGCAGGTGAGCCCGGGCACGACGGTGGCGCTGCGC 720
L G L R A D T E W Q V S P G T T V A L R -

721 AGCGAGCTGGGGTGGCAACACCAGTACGGCGGGCTGGAGCGTGGCACCGGGCTGCGGTTT 780
S E L G W Q H Q Y G G L E R G T G L R F -

781 AACGGCGGCAACGCGCCGTTGCTGGTGGACAGCGTGCCTGGTGTGCGCGACGGGATGGTG 840
N G G N A P F V V D S V P V S R D G M V -

841 CTGAAGGCGGGTGCAGGAAGTGGCGGTGAACGAGAACGCCTCGCTGTGCTGGGCTACGGC 900
L K A G A E V A V N E N A S L S L G Y G -

901 GGGCTGCTGTGCGAGAACCATCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGCTTCACCTGGCGCTTC 960
G L L S Q N H Q D N S V N A G F T W R F -

Figur 23

27/20

1 ATTAATGGCGAAGCCGGTACGTGGGTGCGTCTGCTGAACGGTTCCGGCTCTGCTGATGGC
I N G E A G T W V R L L N G S G S A D G 60
61 GGTTTCACTGACCACTATACCTGCTGCAGATGGGGGCTGACCGTAAGCACGAACCTGGGA
G F T D H Y T L L Q M G A D R K H E L G 120
121 AGTATGGACCTGTTTACCGGCGTGATGGCCACCTACACTGACACAGATGCGTCAGCAGAC
S M D L F T G V M A T Y T D T D A S A D 180
181 CTGTACAGCGGTAAACAAAATCATGGGGTGGTGGTTTCTATGCCAGTGGTCTGTTCCGG
L Y S G K T K S W G G G F Y A S G L F R 240
241 TCCGGCGCTTACTTTGATGTGATTGCCAAATATATTCACAATGAAAACAAATATGACCTG
S G A Y F D V I A K Y I H N E N K Y D L 300
301 AACTTTGCCGGAGCTGGTAAACAGAACTTCCCGCAGCCATTCACTGTATGCAGGTGCAGAA
N F A G A G K Q N F R S H S L Y A G A E 360
361 GTCGGATACCGTTATCATCTGACAGATACGACGTTTGTGTAACCTCAGGCGGAACCTGGTC
V G Y R Y H L T D T T F V E P Q A E L V 420
421 TGGGGAAGACTGCAGGGCCAAACATTTAACTGGAACGACAGTGAATGGATGTCTCAATG
W G R L Q G Q T F N W N D S G M D V S M 480
481 CGTCGTAACAGCGTTAATCCTCTGGTAGGCAGAACCGGCGTTGTTTCCGGTAAACCTTC
R R N S V N P L V G R T G V V S G K T F 540
541 AGTGGTAAGGACTGGAGTCTGACAGCCCGTGCCGGCCTGCATTATGAGTTGATCTGACG
S G K D W S L T A R A G L H Y E F D L T 600
601 GACAGTGCTGACGTTTCATCTGAAGGATGCAGCGGAGAACATCAGATTAATGGCAGAAAA
D S A D V H L K D A A G E H Q I N G R K 660
661 GACAGTCGTATGCTTTACGGTGTGGGGTTAAATGCCCGGTTTGGCGACAATACGCGTTTG
D S R M L Y G V G L N A R F G D N T R L 720
721 GGGCTGGAAGTTGAACGCTCTGCATTGTTGTAATAACAACACAGATGATGCGATAAACGCT
G L E V E R S A F G K Y N T D D A I N A 780
781 AATATTCGTTATTCATTC
N I R Y S F 798

Figur 24

28/20

```

1  TCTTTAGAAAGCGCGGCGGAAGTGTGTATCAATTTGCCCTAAATATGAAAAACCCACC
   S L E S A A E V L Y Q F A P K Y E K P T 60
61  AATGTTTGGGCTAACGCTATTGGGGGAACGAGCTTGAATAGTGGCGGTAACGCTTCATTG
   N V W A N A I G G T S L N S G G N A S L 120
121 TATGGCACAAAGTGGGGCGTAGATGCTTACCTTAACGGGGAAGTGAAGCCATTGTGGGC
   Y G T S A G V D A Y L N G E V E A I V G 180
181 GGTTTTGAAGCTATGTTATAGCTCCTTTAGTAATCAAGCGAACTCTCTTAACCTCTGGG
   G F G S Y G Y S S F S N Q A N S L N S G 240
241 GCCAATAACACTAATTTTGGCGTGTATAGCCGTATTTTGGCTAACCAGCATGAATTTGAC
   A N N T N F G V Y S R I F A N Q H E F D 300
301 TTTGAAGCTCAAGGGGCGCTAGGGACTGATCAATCAAGCTTGAATTTCAAAGCGCTTTA
   F E A Q G A L G S D Q S S L N F K S A L 360
361 TTGCGAGATTTGAATCAAAGCTATAATTACTTAGCCTATAGCGCTGCAACAAGAGCGAGC
   L R D L N Q S Y N Y L A Y S A A T R A S 420
421 TATGGTTATGACTTCGCGTTTTTTAGGAACGCTTTGGTGTAAACCAAGCGTGGGCGTG
   Y G Y D F A F F R N A L V L K P S V G V 480
481 AGCTATAACCATTTAGGTTCAACCAACTTTAAAAGCAACAGCAATCAAAAAGTGGCTTTG
   S Y N H L G S T N F K S N S N Q K V A L 540
541 AAAAATGGTGCAAGCAGTCAGCATTTATTCAACGCTAGTGCTAATGTGGAAGCGCGCTAT
   K N G A S S Q H L F N A S A N V E A R Y 600
601 TATTATGGGGACACTTCATACTTCTACATGAACGCTGGAGTTTACAAGAGTTCGCTAAC
   Y Y G D T S Y F Y M N A G V L Q E F A N 660
661 TTTGGTTCTAGCAATGCGGTGTCTTTAAACACCTTTAAAGTGAATGCTACTCGTAACCT
   F G S S N A V S L N T F K V N A T R N P 720
721 TTAAATACCCATGCGAGAGTGATGATGGGTGGGGAATTAAATAGCTAAAGAAGTGTTC
   L N T H A R V M M G G E L K L A K E V F 780
781 TTGAATTTGGGCTTTGTTTATTTGCACAATTTGATTTCCAATATAGGCCATTTGCTTCC
   L N L G F V Y L H N L I S N I G H F A S 840
841 AATTTAGGAATGAGGTATAGTTTC
   N L G M R Y S F 864

```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

CT/EP 96/01130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29 June 1995	21,36,37
Y	see page 8, line 1 - page 9, line 25	1-25,
	see page 10, line 26 - page 13, line 30; examples 2-5	38-40

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1997

Date of mailing of the international search report

17.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 96/01130

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VACCINE, vol. 12, no. 6, May 1994, pages 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	see the whole document	1,2,9, 10,15, 16,38
X	EMBO J., vol. 11, no. 6, 1992, pages 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgaA-mediated outer membrane transport" see the whole document	21,36,37
Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, 1995, pages 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters" see page 378 - page 380	1-3, 5-10, 20-23, 38-40
Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27 May 1993 see page 6, line 6 - page 10, line 28 see page 12, line 4 - page 13, line 29	1-25
Y	BIO-TECHNOLOGY, vol. 14, no. 2, February 1996, pages 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli" see the whole document	1,2,9-11
Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 17, no. 1, 1995, pages 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion" see the whole document	2,4

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/01130

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>J.BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 3, February 1997, pages 794-804, XP000651378 MAURER, J. ET AL.: "Autodisplay: One-Component System for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli" see the whole document -----</p>	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

P 96/01130

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29.Juni 1995	21,36,37
Y	siehe Seite 8, Zeile 1 - Seite 9, Zeile 25	1-25,
	siehe Seite 10, Zeile 26 - Seite 13, Zeile 30; Beispiele 2-5	38-40

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden will oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

17.04.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 3818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Donath, C

International Application No

T/EP 96/01130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517509 A	29-06-95	DE 4344350 A EP 0731837 A	29-06-95 18-09-96
WO 9310214 A	27-05-93	US 5348867 A CA 2123676 A EP 0746621 A	20-09-94 27-05-93 11-12-96

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VACCINE, Bd. 12, Nr. 6, Mai 1994, Seiten 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	siehe das ganze Dokument	1,2,9, 10,15, 16,38

X	EMBO J., Bd. 11, Nr. 6, 1992, Seiten 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgaA-mediated outer membrane transport"	21,36,37
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 18, Nr. 2, 1995, Seiten 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters"	1-3, 5-10, 20-23, 38-40
	siehe Seite 378 - Seite 380	

Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27. Mai 1993 siehe Seite 6, Zeile 6 - Seite 10, Zeile 28 siehe Seite 12, Zeile 4 - Seite 13, Zeile 29	1-25

Y	BIO-TECHNOLOGY, Bd. 14, Nr. 2, Februar 1996, Seiten 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli"	1,2,9-11
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 17, Nr. 1, 1995, Seiten 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion"	2,4
	siehe das ganze Dokument	

	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01130

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>J.BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 3, Februar 1997, Seiten 794-804, XP000651378 MAURER, J. ET AL.: "Autodisplay: One-Component System for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli" siehe das ganze Dokument -----</p>	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/96/01130

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9517509 A	29-06-95	DE 4344350 A	29-06-95
		EP 0731837 A	18-09-96

WO 9310214 A	27-05-93	US 5348867 A	20-09-94
		CA 2123676 A	27-05-93
		EP 0746621 A	11-12-96

This Page Blank (uspto)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox

This Page Blank (uspto)